

**Interaktionen niedermolekularer Antagonisten  
mit dem Thyreotropin-Rezeptor zur pharmakologischen  
Intervention bei der Endokrinen Orbitopathie**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Patrick Marcinkowski  
Berlin, 2019

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 1. April 2015 bis zum 20. Juni 2019 unter der Leitung von Dr. Gerd Krause am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Gerd Krause
2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Disputation am 16. Dezember 2019

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Dr. Gerd Krause für die Möglichkeit danken, meine Arbeit an diesem interessanten Thema am FMP durchzuführen. Ich danke ihm für die tolle Betreuung, die vielen Ideen und Anregungen. Ich habe in der Zeit am FMP viel von Gerd gelernt.

Bei Prof. Dr. Hartmut Oschkinat möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. Inna Hoyer danke ich für die hervorragenden Arbeiten für ihre Promotion, die mir den Weg für mein Thema geebnet haben.

Prof. Dr. Ralf Schüle, Dr. Claudia Rutz und Dr. Jens Furkert danke ich sehr für die Unterstützung im Labor und für die Denkanstöße zu meiner Arbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Danke Jens, dass er mich auf die Morgenlandfahrt geschickt hat.

Dr. Annika Kreuchwig, Gerd und Franziska Witte danke ich für die Erstellung Homologiemodelle und der Docking-Position, die das Ergebnis dieser Arbeit in der Form erst ermöglicht haben und viel anschaulicher gemacht haben.

Vielen Dank an Dr. Edgar Specker für die zahlreichen Synthesevorschläge, für die Hilfe bei der Kristallisierung der Substanz und für die Initiierung der Enantiomerentrennung, die Sandra Miksche etabliert hat – auch ihr dafür vielen Dank. Dr. Michael Lisurek vielen Dank für noch mehr Substanzen.

Jenny Eichhorst danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung des Bindungs-Assays, Heike Nikolenko für die Hilfe am CD-Spektrometer sowie Dr. Han Sun für die Berechnung des Spektrums.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Anja Eckstein und Dr. Uta Berchner-Pfannschmidt aus Essen sowie Prof. Dr. Dieter Lentz von der Freien Universität Berlin danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Bei **allen** Mitgliedern der Arbeitsgruppen Krause und Schüle möchte ich mich herzlich für die vielen wichtigen Kleinigkeiten inner- und außerhalb des FMPs bedanken, die für mich die Zeit wirklich sehr angenehm gemacht haben. Besonders Sandro Mendieta, der mich durch seine Masterarbeit unterstützt hat, sowie Jonas Protze, nicht zuletzt für seine Hilfe mit der widerspenstigen Informationstechnik und vor allen Katrin Hinz danke ich für die schöne Zeit am FMP und auf den Konferenzen.

Ein großer Dank gilt meiner Familie: Sören, Laura, meine Eltern, und Großeltern. Sie geben mir die Ruhe und Zuversicht, zu machen, was ich will und zu hinterfragen, ob ich will, was ich mache. Vielen Dank an Sören und Bianca für das Lesen der Arbeit. Und danke Heike, ohne die ich vielleicht den Campus Buch nicht kennengelernt hätte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>XI</b>
<b>Abstract</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>15</b>
1.1 Der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR).....	15
1.1.1 Physiologische Einordnung.....	15
1.1.2 Klassifizierung des TSHR.....	15
1.1.3 Struktur und Funktion des TSHR .....	16
1.1.4 Intrazelluläre Effektoren des TSHR.....	18
1.2 Erkrankungen mit autoimmuner TSHR-Überaktivierung .....	20
1.2.1 Morbus Basedow ( <i>Graves' disease</i> ) .....	20
1.2.2 Endokrine Orbitopathie (EO) .....	21
1.3 Allosterische Modulatoren des TSHR.....	24
1.3.1 Positive allosterische Modulatoren.....	24
1.3.2 Negative allosterische Modulatoren.....	25
1.3.3 Der selektive TSHR-Antagonist S37 .....	25
1.4 Zielstellung .....	27
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1 Geräte und Chemikalien.....	29
2.1.1 Geräte .....	29
2.1.2 Chemikalien.....	30
2.1.3 Liganden.....	31
2.1.4 Antikörper .....	31
2.1.5 Enzyme, Fertiglösungen und Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien.....	33
2.1.7 Kits.....	34
2.1.8 Plasmide .....	34
2.1.9 Oligonukleotide.....	34
2.1.10 Zelllinien .....	36
2.1.11 Software.....	36
2.2 Chemische Arbeiten .....	36
2.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	37
2.2.2 Zirkulardichroismus-(CD)-Spektroskopie und -Vorhersage .....	37



2.2.3	Ermittlung der Kristallstruktur von S37a .....	37
2.3	Molekularbiologische Arbeiten.....	38
2.3.1	Plasmid-Präparation.....	38
2.3.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	38
2.3.3	Transformation .....	38
2.3.4	Restriktionsverdau.....	38
2.3.5	Ligation .....	38
2.3.6	Sequenzierung.....	39
2.3.7	Klonierung des humanen TSHR und Generierung der trunkierten TSHR-Konstrukte .....	39
2.3.8	Ortsspezifische Mutagenese .....	40
2.3.9	Klonierung des murinen TSHR .....	40
2.3.10	Generierung der TSHR-FSHR-Chimären mittels restriktionsfreier Klonierung.....	41
2.4	Zellbiologische Arbeiten .....	42
2.4.1	Zellkultur .....	42
2.4.2	Transiente Transfektion.....	42
2.4.3	Herstellung stabil exprimierender Zelllinien .....	43
2.4.4	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie (LSM) .....	43
2.4.5	Durchflusszytometrie .....	44
2.5	Proteinbiochemische Arbeiten .....	46
2.5.1	Immunpräzipitation (IP) .....	46
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
2.5.3	<i>Western Blot</i> .....	47
2.6	Pharmakologische Arbeiten .....	47
2.6.1	Radioliganden-Bindungsassay .....	47
2.6.2	cAMP-Radioimmunoassay (RIA).....	48
2.6.3	$\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierungs-Assay.....	49
2.6.4	NFAT-Reportergen-Assay.....	49
2.6.5	Pharmakokinetik-Untersuchungen von S37a.....	49
2.7	Erstellung der Homologie-Modelle.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Enantiomerentrennung von S37 und Strukturaufklärung des aktiven Enantiomers S37a .....	53
3.2	Ligand-Rezeptor-Interaktion von S37(a) und TSHR.....	55
3.2.1	Trunkierte TSHR-Konstrukte zur Eingrenzung der Bindungsstelle von S37 .....	55

3.2.2	TSHR-FSHR-Chimären bestätigen die Bindung von S37a an der Transmembrandomäne des TSHR mit einem anderen Ansatz.....	60
3.2.3	S37a verhindert die Bindung von bTSH nicht.....	62
3.2.4	Konstitutiv aktive TSHR-Varianten werden von S37a abhängig von ihrer Position inhibiert oder aktiviert.....	65
3.2.5	Die TSHR-Mutationen E404A und H478A werden nicht von S37a inhibiert.....	66
3.3	Struktur-Funktions-Analysen von S37-Analoga.....	67
3.3.1	S37-Derivate mit einzelnen Substitutionen an den Phenylringen .....	68
3.3.2	Katalog-SAR – Weitere S37-Analoga mit Modifikationen an den Phenylringen .....	70
3.3.3	Veränderungen am heterozyklischen Grundgerüst von S37a .....	73
3.4	Therapeutisches Potenzial von S37a.....	76
3.4.1	Inhibition von Thyreoidea-stimulierenden Antikörpern (TSAb) durch S37a .....	76
3.4.2	TSHR-Selektivität von S37-Derivaten.....	77
3.4.3	S37a hemmt die $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung nichtkompetitiv zu bTSH .....	79
3.4.4	Inhibition der $G\alpha_q$ -Protein-vermittelten Signaltransduktion am TSHR durch S37a.....	82
3.4.5	Die Wirkung von S37a auf den murinen TSHR (mTSHR).....	82
3.4.6	Pharmakokinetik von S37a in Mäusen .....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	Eingrenzung der Bindungsstelle von S37a .....	88
4.1.1	Allosterische Wirkungen von S37 am gesamten TSHR.....	88
4.1.2	Allosterische Wirkungen von S37 an trunkierten TSHR-Konstrukten.....	90
4.1.3	TSHR-S37a-Interaktion in CAM.....	92
4.2	Verifizierung der Bindungsstelle von S37a mittels modellgestützter Mutagenese.....	93
4.2.1	<i>Docking</i> -Position von S37a im trunkierten TSHR-Konstrukt EDI.....	93
4.2.2	Die S37a-Position im Gesamt-TSHR-Modell.....	95
4.3	Die intramolekulare Signalweiterleitung an der Schnittstelle von Ekto- und Transmembrandomäne.....	97
4.4	Struktur-Funktions-Beziehungen.....	98
4.4.1	S37-Enantiomere .....	98
4.4.2	S37-Derivate und -Analoga .....	99
4.5	Potenzial von S37a für die Entwicklung einer EO-Therapie.....	101
4.5.1	Bestätigung der TSHR-Selektivität .....	102

4.5.2	<i>Proof of Principle</i> .....	102
4.5.3	Bedeutung der $\beta$ -Arrestin-1-Inhibition .....	103
4.5.4	Die Anwendbarkeit von S37a <i>in vivo</i> .....	104
4.6	Fazit .....	105
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>123</b>
7.1	Liste aller getesteten Substanzen .....	123
7.2	Sequenz-Alignment des murinen und humanen TSHR .....	127
7.3	Pharmakokinetik-Parameter von S37a .....	128
7.4	bTSH-Konzentrations-Wirkungskurven der TSHR-Mutanten zur Identifizierung der Bindungsstelle von S37a .....	129
7.5	Tabellenverzeichnis .....	130
7.6	Abbildungsverzeichnis .....	130
7.7	Abkürzungsverzeichnis .....	133

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des niedermolekularen Liganden S37 mit dem Thyreotropin-Rezeptor (TSHR) untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Bindungsstelle des Antagonisten am TSHR identifiziert, was zu einem verbesserten Verständnis der intramolekularen Signaltransduktion im Rezeptor führte. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Potenzial von S37 für die Therapie der Autoimmunkrankheit Endokrine Orbitopathie (EO) untersucht. Dabei ist hervorzuheben, dass die für die EO entscheidende TSHR-Aktivierung durch Autoantikörper mit S37 *in vitro* bzw. *ex vivo* gehemmt wurde.

Im Rahmen einer Schilddrüsenüberfunktion entwickelt sich bei einigen Patienten die EO am Augenhintergrund, eine potenziell visusbedrohende Krankheit, deren Hauptursache – die TSHR-Überaktivierung durch funktionale aktivierende Antikörper in Orbitafibroblasten – bisher nicht pharmakologisch behandelbar ist, sodass für schwere EO-Fälle eine therapeutische Lücke besteht.

Der TSHR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR). Wie die nah verwandten Gonadotropin-Rezeptoren FSHR und LHCGR gehört der TSHR zur Subfamilie der Glykoproteinhoromon-Rezeptoren (GPHR). Er weist eine große extrazelluläre Domäne mit leucinreichen Wiederholungen (LRRD) auf, an der das Hormon TSH oder funktionale Autoantikörper binden. In der transmembranären Domäne (TMD) des TSHR ist eine allosterische Bindungstasche zwischen den Transmembranhelices (TMH) 3, 5 und 6 beschrieben, in der niedermolekulare allosterische Modulatoren binden. Der Rezeptor wird durch die extrazelluläre Bindung von TSH aktiviert und kann von transmembranär bindenden negativen allosterischen Modulatoren (NAM) inhibiert werden oder von positiven allosterischen Modulatoren (PAM) unabhängig vom Hormon aktiviert werden. Der intramolekulare Mechanismus für die Weiterleitung des Signals von der extrazellulären zur transmembranären Domäne des TSHR ist nicht vollständig geklärt.

In vorangegangenen Arbeiten wurde der selektive TSHR-Antagonist S37 identifiziert. Diese Substanz hatte eine charakteristische gebogene Struktur, lag jedoch als Racemat vor. S37 inhibierte die intrazelluläre cAMP-Bildung mit mikromolarer Affinität und war im Gegensatz zu bisher bekannten TSHR-Antagonisten TSHR-selektiv, inhibierte also nicht die homologen Gonadotropin-Rezeptoren. Daher war S37 besonders interessant als Leitstruktur für die Entwicklung eines Wirkstoffes zur Behandlung der EO. Die bisherigen Versuche wiesen darauf hin, dass S37 kompetitiv zum Hormon wirkt und demzufolge möglicherweise nicht in der bekannten allosterischen Tasche in der TMD bindet.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die strukturelle Interaktion von S37 mit dem TSHR im Detail untersucht werden, um die unbekannte Bindungsstelle zu identifizieren. Parallel wurden Struktur-Funktions-Untersuchungen verschiedener S37-Derivate und -Analoga durchgeführt. Im zweiten Teil der Arbeit ging es darum, Endpunkte zu untersuchen, die für die Therapie der EO entscheidend sind, insbesondere die Inhibition von TSHR-stimulierenden EO-Patientenseren *ex vivo*.

Zuerst wurde das Racemat chiral getrennt und das aktive Enantiomer S37a bzw. dessen dreidimensionale Struktur identifiziert. Mithilfe N-terminal trunkierter TSHR-Konstrukte mit sukzessiver Verkürzung der Ektodomäne sowie durch TSHR-FSHR-Chimären wurde die Bindungsregion von S37a auf die TMD eingegrenzt. Im cAMP-Assay war S37 nicht-kompetitiv zum PAM C2, von dem bekannt war, dass es in der allosterischen Bindungstasche zwischen TMH 3, 5 und 6 bindet. Dadurch wurde deutlich, dass es eine weitere, bislang unbekannte Bindungsstelle für kleine Moleküle an der TMD des TSHR geben muss. Die Bindungsregion wurde mithilfe von TSHR-Mutationen weiter eingegrenzt. Die beiden TSHR-spezifischen Residuen E404 und H478 zeigten bei Austausch mit Alanin einen Verlust der Interaktion mit S37a. In der Arbeitsgruppe konnte die Verbindung plausibel in das TSHR-Modell in eine Tasche zwischen internem Agonisten vor der TMH 1, extrazellulärer Helix der *Hinge*-Region (EH) und extrazellulärem Loop (ECL) 1 gedockt werden. Dadurch konnte das Homologiemodell in diesem Bereich verfeinert werden und das Verständnis der intramolekularen Signalweiterleitung von der Ektodomäne zur TMD verbessert werden. Zusammengefasst kommt es durch die Bindung von TSH an die LRRD des TSHR zur Delokalisierung der EH, vermittelt über eine Disulfidbrücke. Über ein benachbartes Disulfid wird das Signal von der EH auf den internen Agonisten übertragen. Die Konformationsänderung des internen Agonisten, der in Kontakt zu allen drei ECL steht, führt zur Weiterleitung des Signals zu den TMH und zur intrazellulären Seite des Rezeptors. In der identifizierten Bindungstasche interferiert der NAM S37a in diese intramolekulare Aktivierungskaskade an der Schnittstelle zwischen Ektodomäne und TMD des TSHR. Durch die gefundene *Docking*-Position wurde eine Grundlage für die gezielte Verbesserung der Affinität der Leitverbindung S37a geschaffen.

Für die Struktur-Funktions-Untersuchungen wurden einerseits von Kooperationspartnern Synthesen von S37-Derivaten durchgeführt und außerdem kommerziell erhältliche S37-Analoga erworben. Obwohl kein deutlich stärkerer TSHR-Antagonist als S37a identifiziert wurde, lieferten die Struktur-Funktionsanalysen neue Hinweise für weitere Optimierungen an den Phenylringen sowie am heterozyklischen Grundgerüst von S37a für gezielte hydrophile Interaktionen mit dem Rezeptor.

Bei den Untersuchungen der für die Therapie der EO potenziell relevanten Endpunkte wurden drei wichtige Ziele erreicht: 1.) Es wurde der Grundsatznachweis erbracht, dass S37a die erhöhte TSHR-Aktivierung durch stimulierende Antikörper inhibieren kann, und zwar sowohl monoklonale Antikörper *in vitro*, als auch TSHR-aktivierende Seren von EO-Patienten *ex vivo*. 2.) Es konnte gezeigt werden, dass S37a und dessen Derivate hochselektiv nur den TSHR und nicht die homologen Gonadotropin-Rezeptoren inhibieren. 3.) In ersten *in-vivo*-Untersuchungen zur Pharmakokinetik in Mäusen war S37a nicht toxisch und es wurde eine geeignete orale Bioverfügbarkeit erreicht.

Die Untersuchungen bieten eine Grundlage, durch rationales Wirkstoffdesign weitere hochaffine, TSHR-selektive Verbindungen zu synthetisieren, die für die klinische Prüfung geeignet sind.

## Abstract

The present paper investigates the interaction of the small molecule ligand S37 with the thyroid-stimulating hormone (thyrotropin) receptor (TSHR). The first part delineates the identification of the antagonist's binding site at the TSHR, which led to a better understanding of the intramolecular signal transduction within the receptor. The second part describes the therapeutic potential of S37 for the therapy of the autoimmune disease Graves' Orbitopathy (GO). Of note, it was proven that TSHR activation by stimulating autoantibodies, which is a crucial step in GO, was inhibited by S37 *in vitro* as well as *ex vivo*.

In the course of hyperthyroidism some patients develop GO, a potentially sight-threatening disease due to TSHR over-activation in orbital fibroblasts by functional activating antibodies. GO is not treatable pharmacologically at the level of TSHR, because there are no such drugs available in the clinics. For this reason, there is a therapeutic gap for severe cases of GO.

The TSHR is a G protein-coupled receptor (GPCR). Like the closely related gonadotropin receptors FSHR and LHCGR, TSHR belongs to the subfamily of glycoprotein hormone receptors (GPHR). It exhibits a large extracellular leucine-rich repeat domain (LRRD) at which the hormone TSH or functional autoantibodies bind. Located in the transmembrane domain (TMD), there is an allosteric binding pocket between the transmembrane helices (TMH) 3, 5 and 6, where small molecule allosteric modulators bind. The receptor is activated by extracellular binding of TSH and can be inhibited by TMD-binding negative allosteric modulators (NAM) or activated by positive allosteric modulators (PAM) independently of TSH. The intramolecular mechanisms for the signal transduction from the ecto- to the transmembrane domain of TSHR are not completely understood.

In preceding work in the group the selective TSHR antagonist S37 was identified. This compound had a characteristic rigid, bent shape and was present as racemate. S37 inhibited the intracellular cAMP accumulation with micromolar affinity. In contrast to other known TSHR antagonists the effect of S37 was highly TSHR-selective, meaning that it did not inhibit the homologous gonadotropin receptors. Therefore S37 was a particularly valuable lead compound for the development of a drug for the treatment of GO. Previous experiments indicated that S37 is a competitive antagonist of the hormone TSH, and thus potentially does not bind in the common allosteric small molecule pocket in the TMD of TSHR.

In the first part of the present work, the structural interaction of S37 with TSHR was investigated in detail in order to identify its unknown binding site. In parallel, analyses of structure-activity relationships (SAR) of diverse S37 derivatives and analogues was performed. The second part of the work deals with endpoints that are relevant for the therapy of GO, in particular the inhibition of TSHR stimulating GO patients' sera *ex vivo*.

At first, the racemate was separated by chiral HPLC and the 3D structure of the active enantiomer S37a was determined by two independent methods.

With the help of truncated TSHR constructs with successive truncations of the ectodomain as well as with TSHR-FSHR chimaeras, the binding region of S37a was narrowed down to the TMD. However, in the cAMP assay S37a was a non-competitive antagonist of PAM C2, which is known to bind within the allosteric pocket between TMH 3, 5 and 6. It supported the existence of a second, so far unknown binding site for small molecules at the TMD of TSHR. The binding region was further narrowed down by TSHR mutations. The two TSHR-specific residues E404 and H478 showed a loss of interaction with S37a when mutated to alanine. In our group the compound could be reasonably docked into the TSHR model into a pocket between internal agonist prior TMH 1, converging helix of the hinge region (CH) and extracellular loop (ECL) 1, thereby refining the homology model and the understanding of the intramolecular signal transduction within the TSHR. In summary, binding of TSH at the LRRD of TSHR leads to delocalisation of the CH, mediated by a disulphide bond. Via a neighbouring disulphide, the signal is transduced from the CH to the internal agonist, which is in contact with all three ECL. Therefore, the conformational changes of the internal agonist induce via the ECL a shift of the TMH into the active conformation of the receptor. In the identified binding pocket NAM S37a interferes with this intramolecular activation cascade at the interface of the ecto- and transmembrane domain. The proposed docking pose constitutes a basis for the directed improvement of the affinity of the lead structure S37a.

For the structure-activity relationships (SAR), syntheses of S37 derivatives were carried out by cooperation partners or commercially available S37 analogues were purchased. Although no considerably stronger TSHR antagonist than S37a was identified, the SAR studies yielded starting points for further optimisation at the phenyl rings and at the heterocyclic scaffold for directed hydrophilic interactions with the receptor.

During the analyses of endpoints that are potentially relevant for the therapy of GO, three important objectives were achieved: i) The proof of principle was provided that S37a is able to inhibit the elevated TSHR activation by stimulating antibodies. cAMP accumulation induced by monoclonal antibodies was inhibited *in vitro* and that of TSHR activating sera from GO patients *ex vivo*. ii) S37a and its derivatives were highly TSHR-selective and did not inhibit the homologous gonadotropin receptors. iii) In first *in vivo* pharmacokinetics studies in mice, S37a showed no toxicity and a good oral bioavailability was observed.

The study provides a basis for rational drug design to synthesise further TSHR-selective compounds with high affinity suitable for clinical testing.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Thyreotropin-Rezeptor (TSHR)

### 1.1.1 Physiologische Einordnung

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) hat eine wesentliche Bedeutung in der Stoffwechselregulation. Sie sezerniert hauptsächlich die Schilddrüsenhormone Thyroxin ( $T_4$ ) und das aktive Triiodthyronin ( $T_3$ ), welches über die Bindung an nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptoren die Genexpression in vielen Geweben reguliert (Yen, 2001).

Die Schilddrüsenfunktion selbst wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse reguliert. Im Hypothalamus wird das Peptidhormon Thyreoliberin (TRH, *thyrotropin releasing hormone*) gebildet, welches über ein Pfortadersystem zur Adenohypophyse transportiert wird und durch die Bindung an TRH-Rezeptoren die Synthese und Sekretion von Thyreotropin (TSH, Thyreoidea-stimulierendes Hormon) anregt (Yen, 2001).

TSH gelangt über den Blutkreislauf zur Schilddrüse, wo es den TSH-Rezeptor (TSHR) aktiviert. Der TSHR ist das Schlüsselprotein zur Steuerung der Schilddrüsenfunktion. Er induziert die Synthese der Schilddrüsenhormone durch Steigerung der Expression des  $Na^+/I^-$ -Symporters, von Thyreoglobulin und der Thyreoperoxidase (Kopp, 2001; Vassart, Dumont, 1992). Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus von  $T_3$  und  $T_4$  zum Hypothalamus und zur Hypophyse wird die TRH- und TSH-Sekretion streng reguliert (Larsen, 1982).

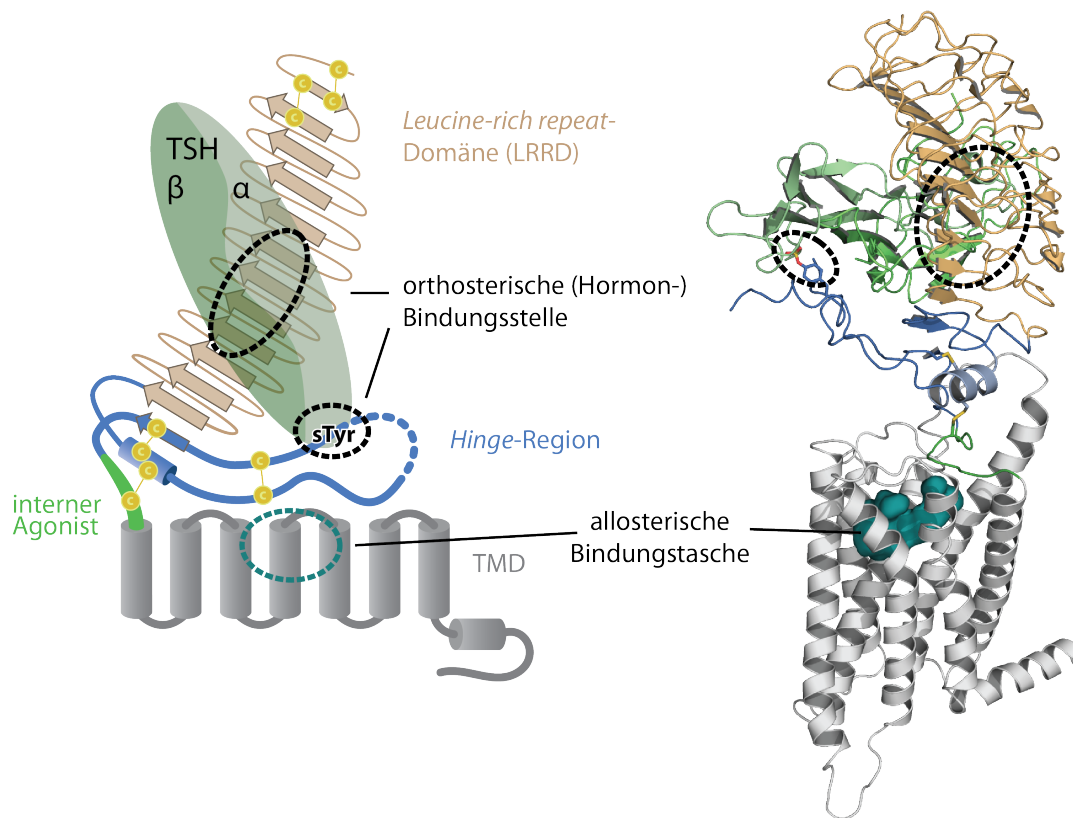
### 1.1.2 Klassifizierung des TSHR

Der TSHR gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die sich in die Klassen Rhodopsin-ähnliche, Glutamat-, Adhäsions-, *Frizzled*- und Sekretin-Rezeptoren aufteilen (Fredriksson, 2003). Die größte Klasse (ca. 60 % aller GPCR) stellen die Rhodopsin-ähnlichen GPCR dar. Der TSHR bildet zusammen mit den Gonadotropin-Rezeptoren Follitropin-Rezeptor (FSHR) und Lutropin/Choriongonadotropin-Rezeptor (LHCGR) die Subfamilie der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren (GPHR) innerhalb der Rhodopsin-ähnlichen GPCR (Fredriksson, Schiöth, 2005). Die jeweiligen Hormone TSH am TSHR, follikelstimulierendes Hormon (FSH) am FSHR und Luteinisierendes Hormon (LH) bzw. Choriongonadotropin (CG) am LHCGR sind etwa 200 Aminosäuren große, glykosylierte Heterodimere, bestehend aus einer gemeinsamen  $\alpha$ -Untereinheit und einer spezifischen  $\beta$ -Untereinheit, die an der großen extrazellulären Domäne der jeweiligen Rezeptoren binden, wodurch diese intrazelluläre G-Proteine, vorrangig  $G_s$ , aktivieren (Szkudlinski, 2015; Schaaf *et al.*, 1997). Die Transmembrandomänen (TMD) der GPHR weisen eine hohe Sequenzidentität von 70 % auf, während die Ektodomänen nur zu 40 % identisch sind (Vassart *et al.*, 2004).



### 1.1.3 Struktur und Funktion des TSHR

Der TSHR (Abb. 1) besteht wie alle GPCR aus einer Transmembrandomäne (TMD) mit sieben Transmembranhelices (TMH), die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen (ECL/ICL, *extra-/intracellular loops*) miteinander verbunden sind, und einer großen für GPCR typischen amino-(N)-terminalen Ektodomäne (Kleinau und Krause, 2009).



**Abb. 1. Strukturbestandteile des TSHR.** Schematische Darstellung (links) und Homologiemodell (rechts) basierend auf den Kristallstrukturen der FSHR-Ektodomäne mit FSH und der Transmembrandomäne (TMD) des  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptors. Die Ektodomäne besteht aus LRRD (hellbraun) und *Hinge*-Region (blau). Die TMD (grau) besteht aus 7 Transmembranhelices (TMH) und einer intrazellulären Helix. In der *Hinge*-Region vor der ersten TMH befindet sich eine 10 Aminosäuren lange agonistische Sequenz (interner Agonist, grün), die über Disulfidbrücken (gelb) an die extrazelluläre Helix (EH) in der *Hinge*-Region und die LRRD gebunden ist. Das heterodimere Hormon TSH hat mindestens zwei Kontaktstellen zum TSHR, eine an der LRRD, die andere an einem sulfatierten Tyrosin (sTyr) in der *Hinge*-Region. In der TMD zwischen TMH 3, 5 und 6 befindet sich eine allosterische Bindungstasche für niedermolekulare Liganden, analog zur orthosterischen Bindungstasche anderer Rhodopsin-ähnlicher GPCR.

**Die TSHR-Ektodomäne** besteht aus der *Leucine-rich-repeat*-Domäne (LRRD, hellbraun in Abb. 1) und aus der *Hinge*-Region (blau, Gelenkregion), welche die LRRD mit der TMD verbindet (Kleinau und Krause, 2009). An der LRRD und am sulfatierten Tyrosin Y385 in der *Hinge*-Region bindet das Hormon TSH (Costagliola, Panneels, 2002). Die Struktur der LRRD in Komplex mit dem inhibierenden Antikörper K1-70 (PDB-Code 2XWT; Sanders *et al.*, 2011), im Komplex mit dem stimulierenden TSHR-Antikörper M22 (PDB-Code 3G04; Sanders *et al.*, 2007) und ohne Ligand (Miller-Gallacher *et al.*, 2019) wurde mittels Röntgenkristallografie aufgeklärt. Darin sind ein antiparalleler und 10 parallele  $\beta$ -Stränge aufgelöst. Wahrscheinlich enthält die LRRD

einen elften und die *Hinge*-Region einen weiteren parallelen  $\beta$ -Strang, die sich an die sensenartige  $\beta$ -Faltblatt-Struktur anschließen (Kleinau *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2012), analog zur Kristallstruktur der FSHR-Ektodomäne im Komplex mit FSH, in der diese Sekundärstrukturelemente der *Hinge*-Region aufgelöst sind (PDB-Code: 4MQW; Jiang *et al.*, 2014).

Die *Hinge*-Region des TSHR enthält im Gegensatz zu den anderen GPHR eine absplaltbare ca. 50 Aminosäuren lange Sequenz (C-Peptid, gestrichelt in Abb. 1), welche den Rezeptor in eine N-terminale A-Untereinheit und eine C-terminale B-Untereinheit teilt, die nach der Spaltung über Cystein-Cystein-Brücken verbunden sind (Misrahi, Milgrom, 1997; Rapoport, McLachlan, 2016; Todorova-Balvay *et al.*, 2007). Die Disulfide können reduziert werden, was zum Abwerfen (*Shedding*) der A-Untereinheit führt, wobei die physiologische Rolle dieses Prozesses unklar ist (Couët *et al.*, 1996; Vassart, Costagliola, 2004). Jedoch wird angenommen, dass das Vorhandensein löslicher TSHR-A-Untereinheiten im Blutkreislauf die Entwicklung von Autoimmunität gegen den TSHR fördert (Chazenbalk *et al.*, 2002). Die A-Untereinheit wird daher für die Immunisierung von Mäusen zur Generierung hyperthyreoter Tiermodelle verwendet (Abschnitt 1.2.2).

TSH oder stimulierende Antikörper (siehe Abschnitt 1.2.1) binden an der Ektodomäne und aktivieren den Rezeptor. Die Mechanismen der intramolekularen Signalweiterleitung an der Schnittstelle der Ektodomäne zur TMD sind nicht voll verstanden. Es wird angenommen, dass die TSHR-Ektodomäne als inverser Agonist auf die TMD wirkt und dieser Effekt bei Hormonbindung aufgehoben wird (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002). Die wichtigsten beteiligten Strukturen bei der Aktivierung sind wahrscheinlich die extrazelluläre Helix in der *Hinge*-Region (EH), an der die Konformationsänderungen der Ektodomäne konvergieren und über das Disulfid-Netzwerk an eine interne agonistische Untereinheit weitergegeben werden (Kleinau *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2012). Die Sequenz dieses internen Agonisten (grün in Abb. 1) wurde durch Peptid-Studien genau definiert und befindet sich in dem in GPHR hoch konservierten Bereich vor der ersten TMH (F<sub>405</sub>NPCEIDIMGY<sub>414</sub>; Brüser *et al.*, 2016). Insbesondere die räumliche Nähe von S281 in der EH und I486 im extrazellulären Loop (ECL) 1 (Schaarschmidt *et al.*, 2016) sowie die kooperative Wirkung von I486, I568 und V656 in den ECL 1, 2 bzw. 3 (Kleinau *et al.*, 2008) führen wahrscheinlich zu einer Verschiebung der TMH zueinander, sodass intrazelluläre Effektoren aktiviert werden können. Die strukturelle Einbindung des internen Agonisten in diesen Prozess ist noch nicht geklärt.

**Die Transmembrandomäne (TMD)** schließt sich an den internen Agonisten an. Sie besteht aus sieben TMH, verbunden über drei ICL und drei ECL sowie aus der intrazellulären Helix 8 und dem Carboxy-(C)-Terminus. Für die TSHR-TMD existiert keine Kristallstruktur, weswegen in der Arbeitsgruppe verschiedene Homologiemodelle anhand sequenzähnlicher Kristallstrukturen aus der Proteindatenbank PDB (rcsb.org; Berman *et al.*, 2002) von Rhodopsin bzw. Opsin (Haas *et al.*, 2011; Kleinau *et al.*, 2010) sowie vom  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor (Neumann *et al.*, 2009) generiert wurden. In der Arbeitsgruppe wurde der Webserver GPCR-SSFE 2.0 ([www.ssfa-7tmr.de/ssfe2](http://www.ssfa-7tmr.de/ssfe2)) entwickelt, der es ermöglicht, anhand charakteristischer Sequenzmotive jeweils

unterschiedliche Vorlagen-*(Template)*-GPCR für jede einzelne TMH auszuwählen und zu modellieren (Worth *et al.*, 2017). Der TSHR wurde in diesem Webserver daher anhand sechs verschiedener *Templates* modelliert.

Bei der Aktivierung des TSHR spielt die TMH 6 eine entscheidende Rolle. Sie stabilisiert wahrscheinlich sowohl die inaktive, als auch die aktive Konformation des TSHR (Kleinau *et al.*, 2013). Polare Seitenketten-Interaktionen zwischen den TMH 2, 3, 6 und 7 stabilisieren die inaktive Konformation des Rezeptors. Durch die Bindung von Agonisten kommt es zu einer starken intrazellulären Auswärtsbewegung der TMH 6 von 8–14 Å und zur Ausbildung der aktiven Konformation, die durch hydrophobe Kontakte zwischen TMH 6 und TMH 5 stabilisiert wird (Kleinau *et al.*, 2011). Wie die TSHR-Aktivierung von den orthosterischen Liganden wie TSH oder Thyreoidea-stimulierenden Antikörpern (TSAb) über die extrazellulären Bestandteile des Rezeptors auf die TMD übertragen wird, ist weitestgehend unklar. Niedermolekulare Agonisten können in der Bindungstasche der TMD durch direkte Interaktion mit den TMH den TSHR allosterisch aktivieren (Abb. 1). Die Verschiebung der TMH 6 bei der Aktivierung des Rezeptors führt zum Verlust der Interaktion (*ionic lock*) zwischen D619 an der TMH 6 und R519 an der TMH 3 (Vassart *et al.*, 2004). R519 ist Bestandteil des in Rhodopsin-ähnlichen GPCR konservierten D/E-R-Y/W-Motivs. Die Auflösung des *ionic lock* durch konstitutiv aktivierende Mutationen (CAM) oder durch Bindung von Agonisten ermöglicht die Anlagerung der G $\alpha$ -Untereinheit und der dadurch ausgelösten der Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins. Der TSHR enthält an der TMH 7 das ebenfalls konservierte NPXXY-Motiv, das auch an der Bindung des G-Proteins beteiligt ist (Deupi *et al.*, 2012). CAM in der TMD des TSHR deuten darauf hin, dass diese Positionen im Wildtyp wichtig sind, um den basalen Zustand des Rezeptors zu stabilisieren. Solche Aminosäuren sind potenzielle Interaktionspartner für Agonisten (Kleinau *et al.*, 2010). Für den TSHR sind verschiedene positive allosterische Modulatoren (PAM) bekannt, die in dieser Tasche binden (Hoyer *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2009; siehe Abschnitt 1.3). Im Gegensatz zu CAM weisen inaktivierende Mutationen auf potenzielle Interaktionsstellen für Antagonisten hin (Haas *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 Intrazelluläre Effektoren des TSHR

Auf der intrazellulären Seite kann der TSHR verschiedene heterotrimere G-Proteine binden (Laugwitz *et al.*, 1996), von denen zu einem großen Teil G $_s$  für die Stimulation der Schilddrüse relevant ist (Jin *et al.*, 1986). Bei höheren TSH-Konzentrationen wird zusätzlich G $_q$  aktiviert, das für die Iodierung der Schilddrüsenhormone notwendig ist (Grasberger *et al.*, 2007; Kero *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 1987). Die intrazelluläre Bindung von  $\beta$ -Arrestin 2 an den TSHR führt hauptsächlich zur Internalisierung des Rezeptors,  $\beta$ -Arrestin 1 induziert MAP-Kinase-*(mitogen activated protein kinase)*-Signalwege (Boutin *et al.*, 2014).

**G-Proteine.** Die Kristallstruktur des aktiven  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors im Komplex mit G $_s$  wurde von Rasmussen *et al.*, 2011, gelöst (PDB-Code 3SN6) und diente als Grundlage für ein TSHR/G $_s$ -Modell (Kleinau *et al.*, 2017). Daraus wird ersichtlich, dass alle ICL und die intrazelluläre Helix 8

an der Bindung mit dem  $G_s$ -Komplex beteiligt sind und der ICL 2 den größten Anteil an der Aktivierung der  $G\alpha$ -Untereinheit hat. Bisher ist nicht klar, welche Strukturen an der spezifischen Bindung von  $G_q$  im Unterschied zu  $G_s$  beteiligt sind (Kleinau *et al.*, 2017), jedoch wurde gezeigt, dass in TSHR-Homodimeren die Besetzung beider Protomere mit TSH für die  $G_q$ -Signaltransduktion erforderlich ist, während die  $G_s$ -Wirkungen nur ein TSH je Dimer benötigen (Allen *et al.*, 2011). Aktiviertes  $G\alpha_s$  induziert an der Adenylylcyclase die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP); in der Folge wird die Proteinkinase A und daraufhin der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) aktiviert.  $G\alpha_q$  induziert den Phospholipase-C-abhängigen Signalweg über die Bildung von Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und die Öffnung von Calciumkanälen, die anhand der Aktivität des Promotors für den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) gemessen werden kann (El-Kaissi, Wall, 2012; Schaarschmidt *et al.*, 2016).

**Arrestin** wurde mit Rhodopsin kokristallisiert (Kang *et al.*, 2015) und als Vorlage für die Modellierung eines TSHR/ $\beta$ -Arrestin-Komplexes verwendet (Kleinau *et al.*, 2017; PDB-Codes: 4ZWI, 5DGY). Ähnlich der  $\alpha 5$ -Helix von  $G\alpha$  (Rasmussen *et al.*, 2007) bindet ein *finger-loop*-Motiv von  $\beta$ -Arrestin an die intrazelluläre Öffnung des GPCR (Scheerer, Sommer, 2017). Im entsprechenden Homologiemodell für TSHR/ $\beta$ -Arrestin ist die Konformation der TMH 6 und des ICL 3 im Vergleich zu TSHR/ $G_s$  verändert (Kleinau *et al.*, 2017).

$\beta$ -Arrestin ist verantwortlich für die Beendigung (Arrest) des GPCR-Signals durch Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors (Goodman *et al.*, 1996). Inzwischen ist bekannt, dass  $\beta$ -Arrestine außerdem verschiedene Signalwege aktivieren, darunter vor allem den MAP-Kinase-Signalweg über ERK (*extracellular signal-related kinase*) 1 und 2, außerdem die Proteinkinase B (AKT) über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signalweg und weitere (Bourquard *et al.*, 2015; Reiter *et al.*, 2012). GPCR-Liganden können funktionelle Selektivität (*ligand bias*) aufweisen, wodurch entweder vorrangig G-Protein-Signale und Clathrin-abhängige Endozytose (Internalisierung) des Rezeptors ausgelöst werden oder  $\beta$ -Arrestin-abhängige Signalwege angeschaltet werden (bzw. im Fall von Antagonisten inhibiert werden). Ausgewogene Liganden (*balanced ligands*), aktivieren/inhibieren beide  $\beta$ -Arrestin-Wirkungen gleichermaßen, sodass es sowohl zur G-Protein- als auch zur  $\beta$ -Arrestin-abhängigen Signaltransduktion kommt (Reiter *et al.*, 2017). Die selektive  $\beta$ -Arrestin-Wirkung wird nicht durch verschiedene  $\beta$ -Arrestin-Isoformen, sondern durch verschiedene GPCR-Kinase-(GRK)-Subtypen vermittelt, welche die GPCR am C-Terminus und an den ICL mit unterschiedlichem Muster phosphorylieren (Reiter *et al.*, 2012).

Während die meisten GPCR eine Präferenz für  $\beta$ -Arrestin 1 oder 2 zeigen (Oakley *et al.*, 2000), wird TSHR über beide  $\beta$ -Arrestine internalisiert, jedoch schneller über  $\beta$ -Arrestin 2 (Frenzel *et al.*, 2006; Voigt *et al.*, 2004). Die Signaltransduktion am TSHR über ERK 1/2 und AKT wird vorrangig über  $\beta$ -Arrestin 1 vermittelt (Boutin *et al.*, 2014). Dieser Signalweg war in der Osteosarkom-Zelllinie U2OS wichtig für die Expression verschiedener Knochenmarker. Da der TSHR in Osteoblasten exprimiert wird, könnte dieser Signalweg wichtig für die Knochenhomöostase

sein (Abe *et al.*, 2003; Baliram *et al.*, 2011). Boutin *et al.*, 2014, konnten zeigen, dass der positive allosterische Modulator (PAM) C2 (siehe Abschnitt 1.3) als *biased ligand* ausschließlich den cAMP-Signalweg, jedoch nicht die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung aktiviert. Dieselbe Arbeitsgruppe stellte später den  $\beta$ -Arrestin-selektiven PAM D3- $\beta$ Arr mit Präferenz für  $\beta$ -Arrestin 1 vor, der den positiven Effekt von TSH auf die Expression von Knochenmarkern in U2OS-Zellen verstärkte (Neumann *et al.*, 2018).

## 1.2 Erkrankungen mit autoimmuner TSHR-Überaktivierung

### 1.2.1 Morbus Basedow (Graves' disease)

Morbus Basedow (*Graves' disease*) ist eine häufige Autoimmunkrankheit, bei der pathogene aktivierende Antikörper gegen den TSHR (TSAb, *thyroid stimulating antibodies*) gebildet werden, die zu einer Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose) führen (Antonelli *et al.*, 2015; Rapoport, McLachlan, 2007). Es kommt zu einer gesteigerten Bildung der Schilddrüsenhormone  $T_3$  und  $T_4$  und dadurch bedingt zu einer reduzierten TSH-Ausschüttung in der Hypophyse. Die häufigsten Symptome sind Erschöpfung, Gewichtsabnahme, Nervosität, erhöhte Körpertemperatur und Herzrasen (Burch, Cooper, 2015).

TSAb erkennen vorrangig die freie A-Untereinheit des TSHR, die wahrscheinlich als Immunogen bei der Entstehung der Autoimmunkrankheit wirkt (Chazenbalk *et al.*, 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass die freie A-Untereinheit in Form von Multimeren die Affinitätsreifung von TSAb in B-Lymphozyten anregt (Rapoport *et al.*, 2015).

Der monoklonale TSAb M22, der aus einem B-Lymphozyten eines Morbus-Basedow-Patienten mittels Hybridom-Verfahren hergestellt wurde (Sanders *et al.*, 2002, 2003), wird häufig als Modellantikörper zur Simulation einer Hyperthyreose *in vitro* und *in vivo* verwendet (z.B. Neumann *et al.*, 2014). Die Bindung von M22 an LRR 1 bis 10 des TSHR weist starke Ähnlichkeit zu der von TSH auf. Dabei spielt wahrscheinlich zusätzlich die Interaktion mit der Hinge-Region eine Rolle für die aktivierende Wirkung von M22, denn im Gegensatz dazu bindet der inhibierende Antikörper K1-70 vorrangig an die LRR 1 bis 8 und interagiert wahrscheinlich nicht mit der Hinge-Region, sondern blockiert die Bindung von TSH oder TSAb (Furmaniak *et al.*, 2015). Es wird angenommen, dass in den meisten Patienten nicht monoklonale, sondern oligoklonale TSHR-Antikörper vorliegen (McLachlan, Rapoport, 1996).

Die Behandlung von Morbus Basedow erfolgt meist mit den Thioamid-Thyreostatika Methimazol, Carbimazol oder Propylthiouracil, welche die Thyreoperoxidase und damit die Synthese von  $T_3$  und  $T_4$  hemmen. Die Behandlung führt in 50 Prozent der Fälle zur dauerhaften Remission der Hyperthyreose, jedoch gibt es seltene schwere Nebenwirkungen wie Agranulozytose, Hepatotoxizität und Pankreatitis sowie die Gefahr von Fehlbildungen des Embryos (Nakamura *et al.*, 2013; Rote-Hand-Brief 6.2.2019). Die Entwicklung einer Hypothyreose oder Progression einer assoziierten Orbitopathie sind selten (Burch, Cooper, 2015).

In Europa erfolgt die Therapie etwas seltener mittels Radioiodtherapie. Hier werden die Thyreozyten der Schilddrüsenfollikel zerstört, wodurch die Schilddrüsenhormonsynthese reduziert

wird. Die Radioiodtherapie führt meist zur Heilung der Hyperthyreose, jedoch entsteht häufig eine Hypothyreose und in 15 bis 20 Prozent der Fälle verschlechtert sich eine bestehende Orbitopathie (Burch, Cooper, 2015).

### 1.2.2 Endokrine Orbitopathie (EO)

Bei etwa der Hälfte der an Morbus Basedow Erkrankten entwickelt sich die Endokrine Orbitopathie (EO, *Graves' orbitopathy*; Wiersinga, Bartalena, 2002). Diese Erkrankung betrifft das Bindegewebe in der Augenhöhle (Orbita) hinter dem Auge. Dabei kommt es zur entzündlichen Schwellung und Verdickung der Augenmuskeln und Vermehrung des orbitalen Fettgewebes mit der Folge eines Exophthalmus sowie zur Fibrose der Augenmuskeln mit dadurch verminderter Augenbeweglichkeit. Dies kann zu unzureichendem Lidschluss, Augentrockenheit und Hornhautläsionen bzw. zu Doppelbildsehen führen. In schweren Fällen (3 bis 5 Prozent der Erkrankten) kommt es zu einer gefährlichen Kompression des Sehnerven (Eckstein *et al.*, 2016).

**Pathogenese.** In der Pathogenese der EO spielen Orbitafibroblasten eine entscheidende Rolle. Im Rahmen entzündlicher Prozesse in der Augenhöhle bilden Orbitafibroblasten Hyaluronan, das zur Bindung von Wasser und dadurch zur Schwellung der Augenmuskeln führt. Sie differenzieren außerdem vermehrt zu orbitalen Adipozyten, mit der Folge der Vergrößerung des Fettgewebes hinter dem Auge. Außerdem können sie zu Myofibroblasten differenzieren, wodurch die Fibrosierung der Augenmuskeln ausgelöst wird (Bahn, 2010).

Als Hauptakteure, die für die pathogenen Veränderungen der Orbitafibroblasten verantwortlich sind, haben sich der TSH-Rezeptor, die Infiltration des orbitalen Bindegewebes mit CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowie der IGF-1-Rezeptor (IGF-1R, *insulin-like growth factor 1 receptor*) herauskristallisiert (Bahn, 2015).

Das gemeinsame Auftreten von EO mit einer Basedow-Hyperthyreose (Wiersinga *et al.*, 1988) sowie die erhöhte Expression des TSHR in Orbitafibroblasten von EO-Erkrankten (Bahn *et al.*, 1998) zeigten, dass der TSHR entscheidend bei der Entstehung der EO ist (Bahn, 2010). TSHR-Mausmodelle, welche durch Immunisierung mit der TSHR-A-Untereinheit EO entwickeln, zeigen, dass der TSHR das primäre pathogene Antigen ist (Bahn, 2013). T-Lymphozyten, welche an das CD40-Antigen auf der Oberfläche von Orbitafibroblasten binden, verstärken durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine das entzündliche Geschehen in der Orbita (Feldon *et al.*, 2005; Kumar, Bahn, 2003). Der IGF-1R verstärkt über einen *Crosstalk* mit dem TSHR die Hyaluronan-Produktion durch Orbitafibroblasten, jedoch nicht, wie zuvor vermutet, durch IGF-1R-aktivierende Autoantikörper (Krieger *et al.*, 2015, 2016, 2017). Der Mechanismus des TSHR/IGF-1R-*Crosstalk* in Orbitafibroblasten ist nicht voll verstanden. Es wurden verschiedene mögliche Interaktionsszenarios diskutiert (Smith, Janssen, 2017): 1.) Beide Rezeptoren schalten über ihren kanonischen Signalweg (TSHR über G<sub>s</sub>/cAMP/Proteinkinase A, IGF-1R über die kleine GTPase Ras) unabhängig MAP-Kinase-Signalwege an; das entspräche streng genommen keinem *Crosstalk*. 2.) Es gibt einen bidirektionalen *Crosstalk* der beiden kanonischen Signalwege auf der Ebene der MAP-Kinasen, wobei es zu einem synergistischen Effekt kommt, der die Summe der

Wirkungen der einzelnen Signalwege übersteigt. 3.) TSHR und IGF-1R interagieren direkt miteinander und bilden funktionale Komplexe, die verstärkt G-Protein- und  $\beta$ -Arrestin-abhängige MAP-Kinase-Signalwege aktivieren. Es gibt Hinweise auf eine mögliche Assoziation von TSHR und IGF-1R an der Plasmamembran von Orbitafibroblasten (Tsui *et al.*, 2008). Dies wurde auch für einen anderen GPCR/Rezeptor-Tyrosinkinase-Komplex gezeigt, der über  $G_i$  den ERK-Signalweg anschaltet (Pyne, Pyne, 2011). Für den TSHR wurde gezeigt, dass durch TSHR/IGF-1R-Crosstalk der ERK-Signalweg  $G_i$ -abhängig aktiviert wurde (Krieger *et al.*, 2017).

**Die Therapie der EO** ist in erster Linie antiinflammatorisch und richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung. Die Grundlage einer erfolgreichen Therapie ist in allen Fällen die Behandlung der Hyperthyreose und möglichst Nikotinkarenz (Eckstein *et al.*, 2016). Bei milder EO kann Selensupplementation zu einer Verbesserung der Entzündung beitragen (Marcocci *et al.*, 2011). Moderat schwere EO wird im aktiven Stadium mit intravenösen Glukokortikoiden und ggf. mit Rituximab (*off label*) behandelt (Eckstein *et al.*, 2016). Weitere Immunsuppressiva, die für andere Erkrankungen zugelassen sind, werden teilweise *off label* zur Behandlung der EO eingesetzt (Cyclosporin, Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil, Tocilizumab; Kotwal, Stan, 2018). Schwere EO mit Sehnervkompression erfordert eine zeitnahe chirurgische Dekompression, wenn Glukokortikoide keine Besserung bewirken (Eckstein *et al.*, 2016).

Dem Entzündungsgeschehen folgt im Abstand von einigen Monaten eine entsprechende Zunahme der Krankheitssymptome, wobei je nach Schwere der EO auch nach vollständigem Abklingen der Entzündung dauerhaft Symptome bleiben (Rundle, 1957). Eine frühzeitige antiinflammatorische Therapie kann daher das Ausmaß der verbleibenden Symptome verringern (Cawood *et al.*, 2004). Oft sind jedoch rehabilitative chirurgische Eingriffe erforderlich, die im inaktiven Stadium der EO durchgeführt werden, darunter Korrektur von Doppelbildsehen durch Augenmuskelchirurgie, sowie Beseitigung von Lidfehlstellungen und Resektion von orbitalem Fettgewebe (Eckstein *et al.*, 2016).

**Kausale pharmakologische Therapieansätze.** Die antiinflammatorische Therapie zielt nicht auf die spezifischen Pathomechanismen der EO ab und genaue Behandlungsempfehlungen gehen nicht klar aus der Studienlage hervor (Bartalena, 2011). Zudem sprechen 60 Prozent der schweren Fälle nicht auf intravenöse Glukokortikoide an, sodass chirurgische Eingriffe erforderlich sind (Currò *et al.*, 2014). Daher besteht ein Bedarf an einer kausalen Therapie der EO. Die aktuellen Ansätze konzentrieren sich auf drei Angriffspunkte: den IGF-1R, die T-Zell-Infiltration der Orbita und den TSHR:

Der inhibierende humane monoklonale **IGF-1R-Antikörper** Teprotumumab wurde in einer klinischen Phase-2-Studie getestet und konnte die EO-Krankheitsaktivität bei moderat bis schwer Erkrankten senken und als erste bisher bekannte Therapie den Exophthalmus reduzieren (Smith *et al.*, 2017) und könnte eine Alternative zur chirurgischen Dekompression sein (Douglas, 2019). Teprotumumab befindet sich im Moment in einer Phase-3-Studie mit dem Ziel der

Zulassung für die EO-Therapie (ClinicalTrials.gov, NCT03298867). Idelalisib, ein niedermolekularer PI3K-Inhibitor, der für chronisch lymphatische Leukämie zugelassen ist, zeigte *in vitro* in Orbitafibroblasten eine Reduktion der Adipogenese, möglicherweise durch die Inhibition des IGF-1R-abhängigen PI3K-Signalweges (Ko, 2018).

Plöhn *et al.*, 2018, konnten zeigen, dass die Synthese von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in Orbitafibroblasten durch die Interaktion mit T-Zellen über CD40-Ligand bzw. CD40-Rezeptor erhöht wird. S1P selbst wirkt chemotaktisch auf T-Zellen, die den S1P-Rezeptor 1 exprimieren und wiederum über CD40-Ligand mit Orbitafibroblasten interagieren. Dies lässt vermuten, dass bei der EO ein sich selbst verstärkender Mechanismus vorliegt, der zur Infiltration der Orbita mit T-Lymphozyten führt. In einem EO-Mausmodell wurde der **S1P-Rezeptor-1-Modulator** Fingolimod getestet, der zurzeit für die Therapie von Multipler Sklerose zugelassen ist. Dieser konnte die Rekrutierung von T-Lymphozyten in das Orbitagewebe sowie die Ausprägung der EO präventiv und therapeutisch deutlich reduzieren oder verhindern (Plöhn, 2019).

Die **Inhibition der TSHR-Überaktivierung** stellt einen wichtigen Ansatzpunkt für die kausale Therapie der EO dar. Zurzeit befindet sich der blockierende monoklonale TSHR-Antikörper K1-70 in einer Phase-1-Studie (ClinicalTrials.gov, NCT02904330). Dieser Antikörper wurde bereits einer Patientin mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom verabreicht und war in der Lage für die Dauer der Applikation die mit dem Karzinom assoziierte Orbitopathie abzumildern (Furmaniak *et al.*, 2018). Ein weiterer Ansatz sind von der TSHR-LRRD abgeleitete zyklische Peptide, welche in einem EO-Mausmodell Orbitasymptome verbesserten, möglicherweise durch Induktion von Toleranz des Immunsystems gegenüber den TSHR (Faßbender *et al.*, 2019; Holthoff *et al.*, 2017; Ungerer *et al.*, 2018). Als dritte Möglichkeit der TSHR-Inhibition kommen negative allosterische Modulatoren (NAM) des TSHR infrage, die im Abschnitt 1.3 genauer beschrieben werden. Diese hätten den Vorteil, dass sie oral und ohne Klinikaufenthalt verabreicht werden können. Zudem sind die Entwicklungs- und Herstellungskosten geringer, als bei Biopharmaka, was vor allem bei seltenen Erkrankungen, wie der EO, bedeutsam sein kann (Reynolds *et al.*, 2013).

**EO-Maus-Modelle** werden benötigt, um die Wirksamkeit einer EO-Therapie *in vivo* zu untersuchen, bevor diese bei Menschen angewendet wird. Es wurden verschiedene Hyperthyreose-Tiermodelle beschrieben, welche das Prinzip haben, Mäuse mit TSHR-Plasmiden zu immunisieren, jedoch wurden Orbitasymptome nicht immer erfasst oder es gelang nicht, diese zu reproduzieren (Überblick in Bahn, 2013 und Banga *et al.*, 2015). 2013 wurde das erste wirkliche EO-Mausmodell beschrieben (Moshkelgosha *et al.*, 2013). BALB/c-Mäuse wurden durch Injektion eines Plasmids für die humane TSHR (hTSHR) A-Untereinheit und Elektroporation viermal im Abstand von drei Wochen immunisiert. Es wurde Veränderungen der Orbita histologisch und mit



Magnet-Resonanz-Tomographie beobachtet, die sehr ähnlich zu denen in EO-erkrankten Menschen waren. Das Maus-Modell von Moshkelgosha et al. aus London konnte in einem zweiten Labor in Essen reproduziert werden (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2016; Schlüter *et al.*, 2018).

Ein anderes Tiermodell nutzt Adenovirus-Transfektion der TSHR-A-Untereinheit, um in BALB/c-Mäusen Basedow-Hyperthyreose hervorzurufen (Holthoff *et al.*, 2015). Auch in diesem Modell ist eine typische EO-Pathologie reproduzierbar (Ungerer *et al.*, 2017).

### 1.3 Allosterische Modulatoren des TSHR

Es sind verschiedene niedermolekulare TSHR-Liganden (*small molecule ligands*, SML) bekannt, darunter Agonisten, neutrale Antagonisten sowie inverse Agonisten; letztere reduzieren auch die TSH-unabhängige Basalaktivität des Rezeptors (Krause, Marcinkowski, 2018). Von den meisten SML wird angenommen, dass sie in der allosterischen Bindungstasche in der TMD des TSHR angreifen, die analog ist zur orthosterischen Tasche anderer Rhodopsin-ähnlicher GPCR (Hoyer *et al.*, 2013). Um die Allosterie dieser Liganden am TSHR zu berücksichtigen, werden Antagonisten und inverse Agonisten als negative allosterische Modulatoren (NAM) und Agonisten als positive allosterische Modulatoren (PAM) bezeichnet.

#### 1.3.1 Positive allosterische Modulatoren

Positive allosterische Modulatoren (PAM) haben in der Klinik Potenzial als Ersatz von rekombinantem humanem TSH, das für die Detektion von Schilddrüsenkarzinom-Metastasen verwendet wird, in denen TSHR überexprimiert ist (Davies, Latif, 2015; Neumann *et al.*, 2016). In der Forschung sind sie von Interesse als Grundlage für die Entwicklung von TSHR-Antagonisten (Neumann *et al.*, 2008).

2006 wurde gezeigt, dass der LHCGR-Antagonist Org41841 auch ein partieller Antagonist des TSHR ist (Moore *et al.*, 2006), der in der TMD der beiden Rezeptoren bindet (Jäschke *et al.*, 2006). Mögliche Kontaktstellen von Org41841 in der Bindungstasche wurden durch konstitutiv aktivierende und inhibierende Mutationen in der TMD beschrieben (s. Abschnitt 1.1.3; Kleinau *et al.*, 2010; Haas *et al.*, 2011; Hoyer *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass für PAM, die zwischen TMH 3, 5 und 6 des TSHR binden, wahrscheinlich der Kontakt zum Methionin M637 an der Unterseite der PAM-Bindungstasche entscheidend für den agonistischen Effekt ist. Der von Org41841 abgeleitete NAM c52 lag in der Bindungstasche etwas höher, als Org41841 und hatte keinen Kontakt zu M637 (Hoyer *et al.*, 2013).

Neumann et al. identifizierten in einem Hochdurchsatz-Screening den TSHR-selektiven Agonisten C2 (*compound 2*) mit nanomolarer Affinität, der in derselben allosterischen Bindungstasche wie Org41841 bindet (Neumann *et al.*, 2009). C2 wurde anschließend in seine Enantiomere getrennt, wobei beide Enantiomere TSHR aktivierten, ein Enantiomer jedoch eine höhere Affinität aufwies als das Racemat (Neumann *et al.*, 2016). Da C2 im Gegensatz zu TSH nicht die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin 1 und 2 zum TSHR aktivierte (Boutin *et al.*, 2014), entwickelten Neumann *et al.*, 2018 den  $\beta$ -Arrestin-selektiven PAM D3- $\beta$ Arr (siehe Abschnitt 1.1.4).

In einer anderen Arbeitsgruppe wurden in einem Hochdurchsatz-Screening zwei weitere PAM für den TSHR identifiziert: MS437 und MS438 waren ebenfalls Agonisten in der TMD, hatten jedoch eine im Vergleich zu C2 leicht veränderte Position der Bindungstasche (Latif *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Negative allosterische Modulatoren

Der PAM Org41841 wies Präferenz am LHCGR auf. Dessen Derivat c52 war der erste beschriebene negative allosterische Modulator (NAM), der vorrangig den TSHR, jedoch auch LHCGR inhibierte (Neumann *et al.*, 2008). Dies weist bereits auf die Schwierigkeit hin, TSHR-selektive NAM zu identifizieren, die in der allosterischen Tasche zwischen TMH 3, 5 und 6 binden. TSHR-Selektivität ist jedoch entscheidend, um Nebenwirkungen auf die Gonadotropin-Rezeptoren zu vermeiden.

Im Fall von C2 gelang es ebenfalls, durch Derivatisierung des Agonisten einen NAM herzustellen. Der inverse Agonist Antag3 inhibierte die TSH-induzierte und die basale TSHR-Aktivität mit niedriger mikromolarer  $IC_{50}$  (50 % *inhibitory concentration*) und wies TSHR-Präferenz auf, inhibierte jedoch auch FSHR leicht. Antag3 inhibierte die durch M22 induzierte cAMP-Bildung und Hyaluronan-Synthese in Orbitafibroblasten (Turcu *et al.*, 2013) und konnte *in vivo* in Mäusen eine durch M22 modellierte Hyperthyreose reduzieren (Neumann *et al.*, 2014).

Van Koppen *et al.* beschrieben 2012 den relativ hochaffinen TSHR-Antagonisten Org274179-0 mit nanomolarer  $IC_{50}$  (Van Koppen *et al.*, 2012). Dieser war jedoch ebenfalls nicht TSHR-selektiv, sondern inhibierte auch FSHR und LHCGR.

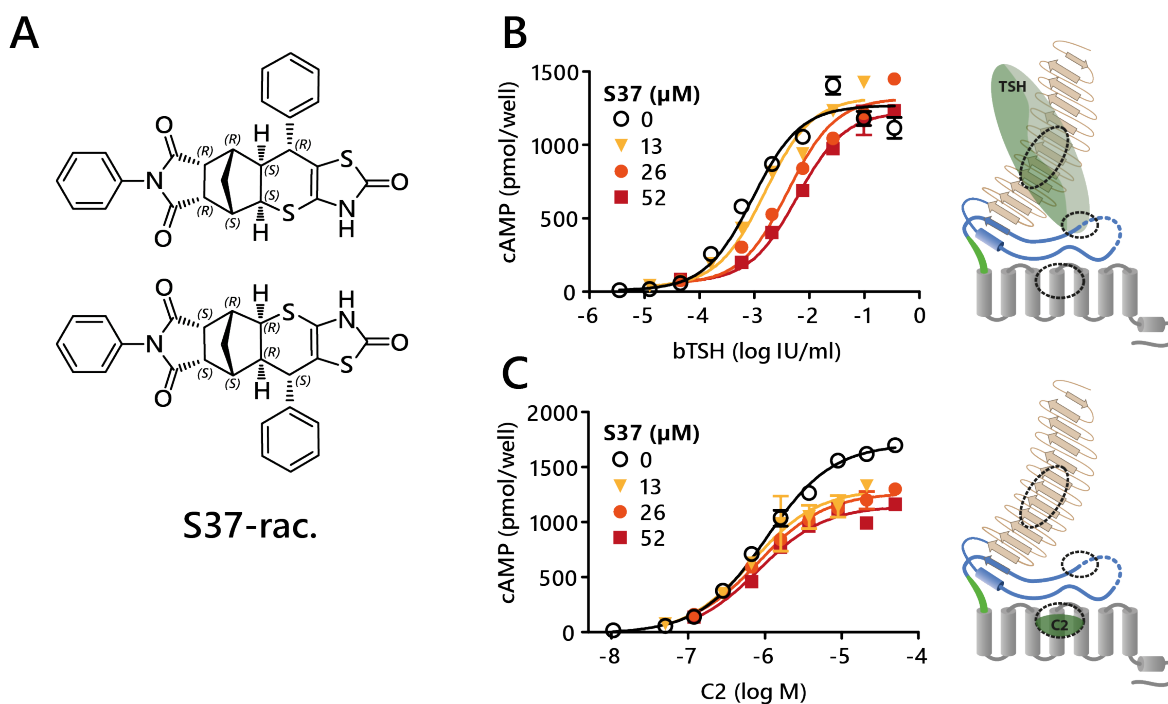
In einem anderen Hochdurchsatz-Screening wurde der TSHR-NAM VA-K-14 (K14) identifiziert (Latif *et al.*, 2016). Dieser inhibierte vorrangig TSHR mit einer  $IC_{50}$  von ca. 1  $\mu$ M, aber auch leicht den FSHR und LHCGR in jeweils verschiedenen Zelltypen. Die Substanz inhibierte den TSAb M22 sowie TSHR-aktivierende Seren von Patienten mit Basedow-Hyperthyreose. K14 wurde in ein Homologiemodell der TSHR-TMD zwischen die TMH 2, 3 und 7 gedockt, was jedoch in der Studie nicht experimentell unterstützt wurde.

### 1.3.3 Der selektive TSHR-Antagonist S37

Zur Identifizierung neuer am TSHR antagonistisch wirkender Substanzen wurde in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Screening Unit des FMP Berlin ein zellbasiertes Hochdurchsatz-Verfahren für TSHR-Antagonisten in stabil mit TSHR transfizierten *chinese-hamster-ovary*-(CHO)-Zellen etabliert und durchgeführt (Dissertation Hoyer, 2014). Darin wurden 12 Hits identifiziert, welche die TSH/TSHR-induzierte cAMP-Akkumulation konzentrationsabhängig inhibierten. Durch einen cAMP-Radioimmunoassay in *human-embryonal-kidney*-(HEK)-293T-Zellen (nachfolgend als HEK-Zellen bezeichnet) wurden die beiden Substanzen S4 und S9 verifiziert, die in einer Konzentration von 50  $\mu$ M den TSHR mehr als 50 Prozent inhibierten. Von beiden Substanzen wurden am FMP in der Abteilung Medizinische Chemie stereoselektive Synthesen der Konfigurationsisomere durchgeführt. Das S4-Isomer S37 erwies sich als stark TSHR-selektiv, da es die verwandten GPHR (FSHR und LHCGR) nicht inhibierte. Die

Substanz hatte eine  $IC_{50}$  von  $28 \mu M$  und wies einen schwachen partialagonistischen Effekt am TSHR auf. Das Racemat S37 enthält sieben chirale Zentren und bildet eine starre gebogene Struktur (Abb. 2 A und 5 D).

Untersuchungen zur Kompetitivität von S37 mit dem Hormon TSH bzw. mit dem PAM C2 lieferten überraschende Ergebnisse. So führte S37 zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von bovinem TSH (bTSH; Abb. 2 B), was auf eine kompetitive Wirkung von S37 zum Hormon hinweist und bedeuten könnte, dass S37 an der TSHR-Ektodomäne bindet oder zumindest auf eine Weise mit der Ektodomäne interagiert, die die Affinität von TSH verändert. Es wäre jedoch ungewöhnlich, dass S37 an der LRRD bindet, denn bisher wird angenommen, dass kleine Moleküle nicht spezifisch an die große flache Struktur der LRRD binden können (Hoyer et al., 2013). S37 wirkte außerdem nichtkompetitiv zu C2 (Abb. 2 C), dessen Bindungsstelle in der TMD zuvor durch Punktmutationen und funktionelle Assays bestätigt wurde (Neumann et al., 2009).<sup>2</sup>



**Abb. 2. S37 und Kompetitivität am TSHR. A:** Strukturformel von S37-rac. als Enantiomerenpaar. **B, C:** cAMP-Akkumulation in stabil mit TSHR transfizierten HEK-Zellen (HEK-TSHR) gemessen mittels Radioimmunoassay (RIA). S37 wirkt **(B)** kompetitiv zu bTSH (Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve) und **(C)** nichtkompetitiv zu C2 (reduzierte Maxima der Konzentrations-Wirkungskurven). Die jeweiligen Agonisten sind im Schema grün dargestellt. TSH hat zwei Kontaktflächen an der Ektodomäne, C2 bindet in der allosterischen Tasche in der Transmembrandomäne.

Die beiden Kompetitivitäts-Studien deuten darauf hin, dass S37 in einer bisher unbekannten Bindungsstelle für kleine Moleküle am TSHR und wahrscheinlich mit der Ektodomäne interagiert. Zusammen mit der hohen TSHR-Selektivität und dem damit verbundenen therapeutischen Potenzial für die endokrine Orbitopathie machten diese Ergebnisse S37 für weitere Untersuchungen besonders interessant.

## 1.4 Zielstellung

Negative allosterische Modulatoren (NAM) des TSHR bieten einen vielversprechenden Ansatz zur Hemmung der pathogenen Stimulierung des TSHR durch Autoimmun-Antikörper und damit für die Therapie der Schilddrüsenüberfunktion, insbesondere der Endokrinen Orbitopathie (EO), für die eine therapeutische Lücke besteht. Die Entwicklung TSHR-selektiver NAM, die nicht die Gonadotropin-Rezeptoren hemmen, stellt jedoch aufgrund der starken Homologie der Transmembrandomäne (TMD) der Glykoprotein-hormon-Rezeptoren (GPHR) eine Herausforderung dar. Die besondere Struktur der GPHR ist charakterisiert durch eine große *leucine-rich-repeat*-Domäne (LRRD), welche bei Hormon-Bindung über eng assoziierte Strukturbestandteile der extrazellulären *Hinge*-Region die TMD in eine aktive Konformation schaltet. Die *Hinge*-Region ist der am wenigsten konservierte Bereich des TSHR und bietet daher einen möglichen Ansatzpunkt für selektive Liganden.

Die vorliegende Arbeit baut auf Ergebnisse der Dissertation von Inna Hoyer auf, welche die Identifizierung des TSHR-selektiven NAM S37 beschreibt. Dieser weist neben der Selektivität besondere pharmakologische Eigenschaften auf. S37 wirkt kompetitiv zu TSH und nicht-kompetitiv zu dem positiven allosterischen Modulator (PAM) C2, was auf eine unbekannte Bindungsstelle für S37 hindeutet, die möglicherweise mit der Interaktion der Substanz mit der TSHR-Ektodomäne und damit einhergehend mit der hohen Selektivität in Verbindung steht. Daher ist S37 in zweierlei Hinsicht besonders interessant. Einerseits war zu klären, ob der TSHR eine für Rhodopsin-ähnliche GPCR ungewöhnliche Bindungsstelle für niedermolekulare Liganden besitzt, die nicht der klassischen Bindungstasche zwischen den TMH entspricht. In dem Zusammenhang sollen die bisher nicht verstandenen molekularen und strukturellen Mechanismen der intramolekularen Signaltransduktion von der Ektodomäne zur Transmembrandomäne im TSHR aufgeklärt werden. Andererseits ist die starke TSHR-Selektivität ein wichtiges Argument, die Eignung von S37 als Leitstruktur für Entwicklung einer pharmakologischen Therapie der EO zu überprüfen. Ferner soll die Aufklärung molekularer Details der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung mittels Mutagenese des Rezeptors Grundlagen für Optimierungen der Leitstruktur schaffen.

Zuerst soll die Bindungsregion von S37 am TSHR eingegrenzt werden. Dafür wurden bereits im Rahmen einer Masterarbeit trunkierte TSHR-Konstrukte generiert, deren Ektodomäne schrittweise verkürzt ist. Anschließend soll anhand von cAMP-Messungen in HEK-Zellen untersucht werden, ob S37 an den trunkierten Konstrukten wirkt oder eventuell nach der Entfernung der Ektodomäne oder Teilen davon nicht mehr bindet. Die Erkenntnisse sollen in unabhängigen Versuchen mit TSHR-FSHR-Chimären überprüft werden und die Bindungsregion mithilfe von Punktmutationen, die basierend auf dem TSHR-Homologiemodell ausgewählt werden, bestätigt werden.

Für Struktur-Funktions-Untersuchungen sollen weitere S37-ähnliche Substanzen sowohl auf ihre antagonistische als auch auf ihre agonistische Wirkung auf den TSHR untersucht werden.

Dadurch können Beziehungen der verschiedenen Strukturbestandteile auf den Wirkungsmechanismus oder die Affinität der Substanz hergestellt werden, die im Zusammenhang mit einer Docking-Position als Ausgangspunkt für die Verbesserung der Leitstruktur dienen können. Für eine genaue pharmakologische Charakterisierung von S37 wird außerdem eine chirale Trennung der Enantiomere angestrebt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, therapierelevante Endpunkte der EO zu untersuchen, um zu zeigen, ob S37 ein geeigneter Kandidat für die Entwicklung eines Arzneistoffs ist. Dafür muss bewiesen werden, dass die Substanz nicht nur den durch TSH induzierten, sondern auch den durch pathogene Antikörper aktivierten TSHR hemmen kann (*proof of principle*). Dazu sollen verschiedene monoklonale Antikörper sowie Serumproben von EO-Patienten verwendet werden, die TSHR-aktivierende pathogene Autoantikörper enthalten.

Die funktionelle Selektivität (*ligand bias*) von S37a zugunsten der Inhibition des cAMP-Signalweges gegenüber der Hemmung der  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung wäre wünschenswert, um mögliche Nebenwirkungen auf die Knochenhomöostase zu vermeiden und soll daher mit einem entsprechenden Assay in einer Knochenzelllinie untersucht werden.

Außerdem sollen durch initiale *in-vivo*-Pharmakokinetik-Studien Voraussetzungen für potentiell weiterführende Untersuchungen von S37 in einem EO-Mausmodell geschaffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Name, Hersteller
Blotkammern	Bio-Rad, München, D
Brutschrank für Bakterien	VEB Laborgeräte Berlin, D
Brutschrank für Zellkultur	Heraeus, Osterode, D
CD-Spektralphotometer	Jasco J-720, Easton, USA
Clean-Bench	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, D
Durchflusszytometer	FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, D
Durchflusszytometer mit Zell-Sorter (FACS)	BD FACS Aria II, BD Biosciences, Erembodegem, B
Elektrophoresekammer	PEQLAB, Erlangen, D
Gammaprobenzähler	Wizard 1470-010, Wallac, USA
Hamiltonpipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Homogenisator	Potter S, B. Braun Biotech International, Melsungen, D
HPLC-Anlage	Agilent 1200 Series, Santa Clara, USA
HPLC-Säule, chiral, <i>reversed-phase</i>	Nucleocel DELTA-RP S, Macherey-Nagel, D
Konfokales-Mikroskop	ConfoCor2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D
Kühlzentrifuge	3K12, Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen, D
Mikroplattenleser	Safire, Tecan, Männedorf, CH
Mikroplattenleser	Infinite F200 Pro, Tecan, Männedorf, CH
PCR-Thermocycler	Tetrad®2, Bio-Rad, München, D
pH-Messgerät	Portamess 911, Knick, Berlin, D
Photometer	GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Rotationsvakuumkonzentrator	Alpha RVC, Christ, Osterode, D
Röntgendiffraktometer	AXS D8 Venture, Bruker, Billerica, USA
Röntgenquelle	Microfocus Cu-K <sub>α</sub> , incoatec, Geesthacht, D
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus, Osterode, D
Transilluminator	Quantity One, Bio-Rad, Milano, I
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen, D
Waagen	Scaltec, Heiligenstadt, D
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Reference, Merck-Millipore, Darmstadt, D
Zell-Harvester-System (Mikroplattenform)	Inotech, Nabburg, D
Zellkulturplatten und -flaschen	TPP, Zürich, CH
Zellkulturmikroskop	Axiovert 40 C, Carl Zeiss, Göttingen, D
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zellzählgerät	CASY TTC, Roche Innovatis, Reutlingen, D

## 2.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
Acetonitril (HPLC grade)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bacitracin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau-Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, D
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, D
cAMP- <sup>125</sup> I-Tyrosylester	IBL International Hamburg, D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, D
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	VWR BDH Prolabo, Leuven, B
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, NL
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, D
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Isopropanol	VWR BDH Prolabo, Leuven, B
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin A (Monosulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	J.T.Baker, Deventer, NL
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T.Baker, Deventer, NL

Name	Hersteller
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pepton	AppliChem, Darmstadt, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Eppenheim, D
Poly-L-Lysin (Hydrobromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ponceau S	SERVA, Heidelberg, D
Protein-A-Sepharose (PAS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Salzsäure 37% (HCl)	VWR BDH Prolabo, Leuven, B
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triethylamin (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trifluoressigsäure (C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Seromed GmbH, Wien, A
Trypsin-Inhibitor (Soja)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, D

### 2.1.3 Liganden

- TSH aus der bovinen Hypophyse (bTSH) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)
- <sup>125</sup>I-bTSH (Thermo Fisher Scientific TRAK kit, B.R.A.H.M.S, Hennigsdorf, D)
- M22 monoklonaler humaner TSHR-stimulierender Antikörper (RSR Ltd., Cardiff, UK)
- KSAb1 monoklonaler muriner TSHR-stimulierender Antikörper (Paul Banga, Essen, D)
- rekombinantes humanes (rh) FSH (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Sauvagine (Michael Beyermann, ehem. IWF Berlin, D; Beyermann *et al.*, 1996)
- humanes Choriongonadotropin (hCG; Calbiochem, Bad Soden, D)
- C2, Antag3 (Susanne Neumann und Marvin C. Gershengorn, NIH Bethesda, USA)
- VA-K-14 (Enamine, Riga, LV)
- Substanzen 39, 40, 41, 46, 48 (ChemSpace, Riga, LV)
- Substanzen 42, 43, 44, 45, 47, 49, 50 (Vitas-M Lab, Hong Kong)

### 2.1.4 Antikörper

#### Primärantikörper (monoklonal, Maus-IgG)

- anti-TSHR 4C1 (sc-32262; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
- anti-GFP GFP02 (AG Schülein, FMP Berlin)
- anti-GFP JL-8 (Clontech, Mountain View, USA)



### Sekundärantikörper

- Ziege anti-Maus IgG (H+L) – Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiert (Dianova, Hamburg, D)
- Ziege F(ab')<sub>2</sub> anti-Maus IgG Fc<sub>γ</sub> – R-Phycoerythrin-(PE)-konjugiert, für Durchflusszytometrie (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA)

### Antikörper für den Radioimmunoassay (RIA)

- Kaninchen anti-cAMP-Succinimidyl-Proteinkonjugat, polyklonal (AG Rosenthal, FMP Berlin)

## 2.1.5 Enzyme, Fertiglösungen und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid, Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, D
BSA-Lösung 30 % steril, Azid-frei	Seralab, West Sussex, UK
cAMP-Standard 1 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA-Polymerase Opti <i>Taq</i> 5000 U/ml	Roboklon, Berlin, D
DNA-Polymerase <i>Pfu</i> Turbo 2,5 U/ml	Agilent, Waldbronn, D
DNA-Probenpuffer 6fach	New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main, D
DNA-Standard 1 kb	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
DPBS (Dulbecco's PBS) für die Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
isotonische Kochsalzlösung CASY <sup>®</sup> ton	Roche Innovatis, Reutlingen, D
Geneticin (G418-Sulfat)	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Glasfaserfilter IH-201-C	Inotech, Nabburg, D
L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin, D
Hygromycin B, 50-mg/ml-Lösung CELLPURE	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mikrotiterplatten 96-Well, weiß „Nunclo“	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Nitrozellulose-Membran „Whatman“	GE Healthcare, Solingen, D
Nukleinsäure-Farbstoff RedSafe	iNtRON Biotechnology, Sangdaewon-Dong, Korea
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10000 U, 10 mg/ml	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, USA
Protein-Probenpuffer Roti-Load 4fach	Carl Roth, Karlsruhe, D
Protein-Standard Precision Plus	Bio-Rad, München, D
Restriktionsendonukleasen 20000 U/ml	NEB, Frankfurt/Main, D
T4-Polynukleotid-Kinase	NEB, Frankfurt/Main, D
T4 DNA-Ligase 400000 U/ml	NEB, Frankfurt/Main, D
Trypsin + EDTA 10fach	PAA Laboratories, Pasching, A
Zellkulturmedium DMEM GlutaMAX low Glucose (1 g/l)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
DMEM GlutaMAX high Glucose (4,5 g/l)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Zellulose-anti-Rabbit-Suspension Sac-Cel	IDS Ltd., Boldon, UK

### 2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit vollentsalztem Wasser hergestellt. Abgesehen von den hier angegebenen Puffern und Medien wurde für die Molekularbiologie und für die Herstellung von Lösungen für die Zellkultur autoklaviertes Reinstwasser (18,2 MΩcm) aus der Milli-Q-Anlage verwendet.

Name	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> → pH 7,4
<b>Puffer und Nährmedien für die Molekularbiologie</b>	
TAE-Puffer	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 10 mM EDTA → pH 7,8
DNA-Ladepuffer	0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 1 mM EDTA (pH 8,0); 50 % (w/v) Glycerol
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton/Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl → pH 7,5
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Trypton; 20 mM Glucose; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> → pH 7,5
LB-Agar-Medium	1,5 % (w/v) Agar-Agar; 30 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin → gelöst in LB-Medium
<b>Puffer für die Immunpräzipitation und Western Blot</b>	
Waschpuffer I	50 mM Tris; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS → pH 8,0
Waschpuffer II	50 mM Tris; 1 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS → pH 7,4
Puffer A	50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS → pH 8,0
Lysispuffer	10 ml Puffer A; 125 µl PMSF-Lösung (40 mM in Ethanol); 80 µl Protease-Inhibitor-Mix (0,4 mg/ml Trypsin-Inhibitor (Soja); 0,25 mg/ml Aprotinin; 9,8 mg/ml Benzamidin)
Trenngelpuffer	0,75 M Tris → pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris → pH 6,8
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; → pH 8,3
Transferpuffer (Western Blot)	19,8 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,015 % (w/v) SDS → pH 8,3
TBS	50 mM Tris; 150 mM NaCl → pH 7,2
TBS-T	0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS
Blockpuffer	2 % (w/v) BSA in TBS-T
Ponceau-Rot-Färbelösung	2 % (w/v) Ponceau S; 30 % (w/v) TCA; 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure-Dihydrat → Gebrauchslösung: 0,6 % in H <sub>2</sub> O
Detektions-Färbelösung	NBT 480 µM; BCIP 562 µM → frisch aus jeweils 20fach konzentrierter Stammlösung in 10 mM Tris pH 9,5
<b>Puffer für die Durchflusszytometrie</b>	
FACS-Puffer	0,5 % BSA → in PBS
EDTA/EGTA-Puffer	1 mM EDTA; 1 mM EGTA → in PBS
<b>Puffer für den Radioimmunoassay (RIA)</b>	
RIA-Grundpuffer	100 mM Natriumacetatpuffer → pH 6,0
RIA-Vollpuffer	RIA-Grundpuffer; 0,1 % BSA; 0,1 % Triton X-100
Extraktionsmedium	0,1 % Trifluoressigsäure; 0,005 % Triton X-100
Stimulationsmedium	10 mM HEPES; 0,5 % BSA; 0,25 mM IBMX → in DMEM
Acetylierungsreagenz	1 Teil (v) Essigsäureanhydrid; 2 Teile (v) Triethylamin

Name	Zusammensetzung
<b>Puffer für den Radioliganden-Bindungsassay</b>	
Tris-BAME	50 mM Tris; 2 mM EGTA; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 g/l BSA; 213 µg/ml Bacitracin; 80 µg/ml Benzamidin; 17 µg/ml Aprotinin; 3 µg/ml Trypsin-Inhibitor (Soja); 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) → pH 7,5

### 2.1.7 Kits

- NucleoBond XtraMidi (Macherey-Nagel, Düren, D)
- NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, D)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, D)
- ONE-Glo Luciferase AssaySystem (Promega, Madison, USA)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- PathHunter AssayComplete Cell Plating 5 Reagent (DiscoverX, Fremont, USA)
- PathHunter Chemiluminescence Detection Reagent (DiscoverX, Fremont, USA)

### 2.1.8 Plasmide

Der Vektor für die folgenden Plasmide war pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, USA).

vollständiger Name	Kurzform	kodiert für Aminosäuren des wt-TSHR (zusätzliche oder veränderte AS im Einbuchstabencode angegeben)
pTSHR-GFP (Teichmann <i>et al.</i> , 2014)		<b>1-764</b>
pSP-FLAG-EcoRI(GIQ)-TSHR-GFP	FLAG-TSHR-GFP*	<b>1-24 / DYKDDDDK GIQ / 28-764</b>
pSP-FLAG-KNQK-GFP	KNQK	<b>1-24 / DYKDDDDK GIQ / 287-764</b>
pSP-FLAG-GFGQ-GFP	GFGQ	<b>1-24 / DYKDDDDK GIQ / 365-764</b>
pFLAG-ΔSP-EDI-GFP	EDI	M DYKDDDDK GIQ / <b>409-764</b>
pmTSHR-GFP	mTSHR	<b>1-764</b>
pSP-FLAG-FSHR-GFP		(FSHR)
pSP-FLAG-TSHR(LRRD)-FSHR(Hinge/TMD)-GFP	TSHR×FSHR	<b>1-24 / DYKDDDDK GIQ / 28-280 / (FSHR-Hinge-TMD)</b>
pSP-FLAG-FSHR(LRRD)-TSHR(Hinge/TMD)-GFP	FSHR×TSHR	SP-DYKDDDDK-(FSHR-LRRD) / <b>281-764</b>

\* Je nach Kontext auch „wt-TSHR“. Nur in stabil transfizierten HEK-TSHR-Zellen (s. Abschnitt 2.4.1) lag TSHR ohne *Tags* vor.

Der Vektor pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro] (Promega, Madison, USA) für den G<sub>q</sub>/NFAT-Reporter-Gen-Assay war ein Geschenk von Dr. Heike Biebertmann (Charité Berlin).

### 2.1.9 Oligonukleotide

Die Primer wurden durch die BioTeZ Berlin Buch GmbH synthetisiert. *forward*-Primer sind mit A, *reverse*-Primer mit B gekennzeichnet (siehe nächste Seite).

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung
<b>muriner TSHR</b>	
mTSHR-AfeI-A	TATTCTAGCGCTATGAGGCCAGGG
mTSHR-EcoRI-B	CTGCAGAATTCCTCAAGGCTGTTTGC
<b>TSHR-FSHR-Chimären</b>	
Fvec-TSHRIrrd-A	GCTAGGGCGAATTGGGCCATGAGGCCGGCGGACTTGC
Fvec-TSHRIrrd-B	GATTTGCCGTCTCCAGTTTGCAAAAGCACAGCAGTGGC
Tvec-FSHRIrrd-A	CGAGGTCCCGAGTCCCGTGGAAAATGGCCTTGCTCCTGG
Tvec-FSHRIrrd-B	CCTCTGATTTTCTTCTGATTCTTAAAGGCACAGCAATGG
FSHR-LRRD-A	TGTCATCATCGGATCTGTCACTGCTC
FLAGwhole-FSHR-B	CTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCTCCTGAGCCCAAGCTC
<b>Mutagenese-Primer (CAM)</b>	
R310C-A	GTATGCAGAGCTTGTGCCAGAG
R310C-B	CTCTGGCACAAGCTCTGCATAC
N406D-A	GATGAGTTCGACCCGTGTGAAG
N406D-B	CTTCACACGGGTCTGAACTCATC
I486F-A	CTACAACCATGCCTTCGACTG
I486F-B	CAGTCGAAGGCATGGTTGTAG
I568T-A	CAAAGTCAGTACCTGCCTGCC
I568T-B	GGCAGGCAGGTAAGTACTTTG
V656F-A	GCCTCTCATCACTTTTAGCAACTC
V656F-B	GAGTTGCTAAAAGTGATGAGAGGC
<b>Mutagenese-Primer (Bindungsstelle)</b>	
E404A-A	CCAAGTCCGATGCGTTCAACCC
E404A-B	GGGTTGAACGCATCGGACTTGG
Y414A-A	CATAATGGGCGCCAAGTTCCTG
Y414A-B	CAGGAACTTGGCGCCCATTATG
Y414F-A	CATAATGGGCTTCAAGTTCCTG
Y414F-B	CAGGAACTTGAAGCCCATTATG
H478A-A	CCTCTACACTGCCTCTGAGTAC
H478A-B	GTACTCAGAGGCAGTGTAGAGG
E480A-A	CTACACTCACTCTGCGTACTAC
E480A-B	GTAGTACGCAGAGTGAGTGTAG
S567A-A	GCCAAAGTCGCTATCTGCCTG
S567A-B	CAGGCAGATAGCGACTTTGGC
S657A-A	CACTGTTGCCAACTCCAAAATC
S657A-B	GATTTTGGAGTTCGCAACAGTG
<b>Sequenzierung</b>	
CMVF_pCDNA3	CAACGGGACTTTCCAAAATG
EGFP C R	GTTCAAGGGGGAGGTGTG
EGFP Nrev	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
hTSHR-4a-jw	TGTAATGAGAGCAGTATGC
hTSHR-11b-jw	GTTGTAAGTGCAGGATTTCCG
h/mTSHR-3a-jw	AAGCTGGATGCTGTTTACC
h-mTSHR-3b	GGTAAACAGCATCCAGCTT

### 2.1.10 Zelllinien

Name	Kulturmedium	Herkunft
HEK-293T (HEK) (human embryonal kidney)	DMEM GlutaMAX low Glucose *	DSMZ, Braunschweig, D
HEK-293T-TSHR-pcDNA3 (HEK-TSHR)	DMEM GlutaMAX high Glucose * 250 µg/ml Hygromycin	Arbeitsgruppe Dr. Ralf Paschke (Universität Leipzig)
HEK-293T-FSHR-pcDNA3 (HEK-FSHR)	DMEM GlutaMAX high Glucose * 250 µg/ml Hygromycin	Arbeitsgruppe Dr. Ralf Paschke (Universität Leipzig)
HEK-293T-LHCGR-pcDNA3 (HEK-LHCGR)	DMEM GlutaMAX high Glucose * 250 µg/ml Hygromycin	Arbeitsgruppe Dr. Ralf Paschke (Universität Leipzig)
HEK-293T-CRF1R-Kaede (HEK-CRF1R)	DMEM GlutaMAX low Glucose * 400 µg/ml Geneticin	FMP Berlin, Konstrukt siehe Schmidt <i>et al.</i> , 2009
HEK-293T-FLAG-TSHR-GFP (wt-TSHR in Abschnitt 3.2.1)	DMEM GlutaMAX low Glucose * 400 µg/ml Geneticin	diese Arbeit
HEK-293T-FLAG-KNQK-GFP	DMEM GlutaMAX low Glucose * 400 µg/ml Geneticin	diese Arbeit
HEK-293T-FLAG-GFGQ-GFP	DMEM GlutaMAX low Glucose * 400 µg/ml Geneticin	diese Arbeit
HEK-293T-FLAG-EDI-GFP	DMEM GlutaMAX low Glucose * 400 µg/ml Geneticin	diese Arbeit
U2OS-TSHR/β-Arrestin-1	U2OS Cell culture kit 10	(DiscoverX, Fremont, USA)

\*supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung

### 2.1.11 Software

- ChemDraw Version 8 (Perkin Elmer, Waltham, USA)
- Clone Manager Professional Suite Version 8  
(Scientific & Educational Software, Denver, USA)
- FCS Express Flow Cytometry RUO, Versionen 3 bis 6  
(De Novo Software, Glendale, USA)
- Image J 1.52 (NIH, Bethesda, USA)
- Prism 5 für Windows (GraphPad Software, CA, USA)
- Pymol Version 1.8.4.2 (Schrödinger LLC, New York, USA)

## 2.2 Chemische Arbeiten

Der methodische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten. Die beschriebenen chemischen Arbeiten wurden vollständig oder unter Anleitung erfahrener Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (AG) Medizinische Chemie am FMP Berlin (E. Specker, S. Miksche) für die Synthese der S37-Derivate bzw. die Trennung der S37-Enantiomere, der AG Drug Design, FMP (H. Sun) für die CD-Spektrum-Vorhersage und des Instituts für Anorganische Chemie, Freie Universität Berlin (D. Lentz) für die Kristallstruktur-Analyse, durchgeführt. Die Synthese der S37-Derivate (Abschnitt 3.3.1) und deren Analyse mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) sind in der

veröffentlichten Patentanmeldung PCT/EP2017/059930 (Krause *et al.*, 2017) beschrieben. Für die vorliegende Arbeit relevante chemische Methoden werden hier zusammengefasst.

### 2.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Trennung des Racemats S37 erfolgte zuerst an einem analytischen HPLC-Gerät unter Verwendung einer chiralen *reversed-phase*-Säule bei 30 °C. Pro Lauf wurden 100 µl S37 (1 mg/ml in Acetonitril/Wasser, 50/50) injiziert. Eine klare Trennung der Enantiomere wurde bei isokratischer Elution mit Acetonitril/Wasser (70/30) als mobile Phase bei einer Flussrate von 1 ml/min erreicht. Die Detektion erfolgte mittels Diodenarray-Detektor (DAD) bei 254 nm. Da der Aufbau einer präparativen HPLC nicht möglich war, wurden die Enantiomere manuell getrennt. Das erste Enantiomer (S37a) wurde von 5,0 bis 5,4 Minuten gesammelt, das zweite (S37b) von 5,9 bis 6,9 Minuten.

Später wurde die Firma SiChem (Bremen, D) mit der Trennung bzw. die Firma ChemDiv (San Diego, USA) mit der Synthese und Trennung der S37-Enantiomere beauftragt.

### 2.2.2 Zirkulardichroismus-(CD)-Spektroskopie und -Vorhersage

S37-rac. sowie die Enantiomere S37a und S37b wurden jeweils in einer Konzentration von 2 mM in Acetonitril gelöst und in einer Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke am CD-Spektralphotometer bei Wellenlängen von 225 bis 350 nm (1 nm Bandbreite) analysiert. Die Daten wurden als Elliptizität in millidegree (mdeg) angegeben.

Für die Vorhersage des CD-Spektrums *in silico* wurde die Struktur des S37-Enantiomers (4aS,5S,5aR,8aR,9R,9aS,10R)-7,10-Diphenyl-5,5a,8a,9,9a,10-hexahydro-5,9-methanothiazolo(5',4':5,6)thiopyrano(2,3-f)isoindol-2,6,8(3H,4aH,7H)-trion verwendet. Die energieminierte Struktur wurde mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT) im B3LYP/6-31G(d)-Verfahren optimiert und anschließend die Anregungsenergien sowie Rotations- und Oszillatorstärke der 50 am niedrigsten erregten Zustände durch zeitabhängige DFT (B3LYP/6-31G(d)) berechnet. Die DFT-Berechnungen wurden mit der Software Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2016) durchgeführt.

### 2.2.3 Ermittlung der Kristallstruktur von S37a

Kristalle wurden in einer übersättigten Lösung von S37a in 1,4-Dioxan erhalten. Ein Kristall wurde am Röntgendiffraktometer untersucht und die Beugungsdaten mit der APEX3-Software erfasst. Mit Hilfe der Programme SHELXT- und SHELXL (Sheldrick, 2015, 2015a) wurde anschließend die Kristallstruktur aufgelöst und damit die absolute Konfiguration von S37a bestimmt. Die Kristallisationsdaten sind im *Cambridge Crystallographic Data Centre* unter der CCDC-Nummer 1894120 hinterlegt und werden im Zuge der Publikation freigegeben.

## 2.3 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.3.1 Plasmid-Präparation

Plasmid-DNA wurde in kleinen Mengen mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit, in größeren Mengen mit dem NucleoBond-XtraMidi-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aus einer 5-ml- bzw. 100-ml-Übernachtskultur isoliert und in sterilem Reinstwasser eluiert. Die DNA-Konzentration wurde am UV-Photometer bei 260 nm bestimmt.

### 2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Eine 5-ml-Vorkultur *E. coli* vom Stamm DH5 $\alpha$  (Stratagene) wurde über Nacht bei 37°C in LB-Medium geschüttelt. Davon wurden 100  $\mu$ l in eine zweite 5-ml-Vorkultur überimpft und erneut über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wurde im Verhältnis 1:1000 in 400 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C mit 165 rpm für etwa 2 ½ Stunden bis zu einer OD 600 von 0,02 bis 0,03 geschüttelt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C in einer vorgekühlten Zentrifuge. Die Bakteriensuspension wurde 10 Minuten bei 4000  $\times$  g zentrifugiert, das Pellet einmal mit 20 ml einer sterilen 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und dann bei 2000  $\times$  g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 20 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (steril) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei 2000  $\times$  g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 4 ml in einer sterilen 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Schließlich wurde die Suspension aliquotiert und bei – 80 °C aufbewahrt.

### 2.3.3 Transformation

4  $\mu$ l Plasmid-DNA und 45  $\mu$ l chemisch kompetente *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) wurden für die Transformation gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurde 1 ml LB-Medium oder bei geringen DNA-Mengen SOC-Medium hinzugegeben. Die Bakterien wurden eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 20 bis 500  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.3.4 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 20  $\mu$ l 10 U jeder Restriktionsendonuklease und der entsprechende Reaktionspuffer (New England Biolabs) mit ca. 1  $\mu$ g Plasmid-DNA gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Zur Analyse oder weiteren Verwendung der DNA-Fragmente wurden diese mittels Gelelektrophorese in einem 1-%-Agarosegel in TAE-Puffer bei konstanten 100 V aufgetrennt.

### 2.3.5 Ligation

Die zu ligierende DNA wurde mit dem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin-Gel-and-PCR-Clean-up-Kit (Macherey-Nagel) aus dem Gel isoliert. In einem

20- $\mu$ l-Ansatz wurde die DNA (molares Verhältnis Vektor:Insert = 1:5; insgesamt 100 ng DNA) zusammengeführt und durch die Zugabe von 400 U T4-DNA-Ligase (NEB) im beiliegenden Puffer, welcher bereits ATP enthielt, über Nacht bei 16 °C.

### 2.3.6 Sequenzierung

Die Konstrukte wurden nach der Methode von Sanger *et al.*, 1977, durch die Firma Source BioScience (Nottingham, UK) durchgeführt. Die Sequenzierprimer sind im Abschnitt 2.1.9 aufgeführt.

### 2.3.7 Klonierung des humanen TSHR und Generierung der trunkierten TSHR-Konstrukte

Diese Arbeiten wurden ausführlich in der vorangegangenen Masterarbeit (Marcinkowski, 2015) beschrieben und werden hier zusammengefasst, um den Aufbau und die Verwendung der Konstrukte verständlich zu machen.

**Wildtyp-(wt)-TSHR.** Die cDNA des humanen TSHR (hTSHR) lag im pEGFP-N1-Vektor vor (Teichmann *et al.*, 2014), sodass EGFP (nachfolgend GFP genannt) mit dem C-Terminus des TSHR fusioniert war (pTSHR-GFP). Eine EcoRI-Schnittstelle wurde zwischen die TSHR-Aminosäurepositionen C24 und S25 mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt. Dadurch wurden hinter dem TSHR-Signalpeptid (SP) und der Schnittstelle der Signalpeptidase die Aminosäuren G, I und Q inseriert. Zwischen der EcoRI-Schnittstelle und der Signalpeptidase-Schnittstelle wurde mittels *Overlap-extension-PCR* (Ho *et al.*, 1989) ein FLAG-Tag eingefügt, der nach der Abspaltung des Signalpeptids am N-Terminus verbleibt. Das so generierte Plasmid pSP-FLAG-EcoRI(GIQ)-TSHR-GFP, kurz pFLAG-TSHR-GFP, wurde für die stabile Expression in HEK293T-Zellen (nachfolgend HEK-Zellen, s. Abschnitt 2.4.1) nur zum Vergleich mit den trunkierten TSHR-Konstrukten verwendet. Außerdem diente es als Vorlage für die Generierung der TSHR-FSHR-Chimären sowie für die Punktmutationen und wurde dort transient transfiziert. Die vollständige Bezeichnung ist wegen der Übersichtlichkeit in den Abbildungen nicht angegeben, ergibt sich aber aus dem Kontext.

In allen anderen Versuchen mit stabil transfizierten HEK-Zellen lag der wt-TSHR ohne *Tags* im Vektor pcDNA3 vor (Hoyer, 2014). Diese Zelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit als HEK-TSHR bezeichnet.

**Die trunkierten TSHR-Konstrukte.** KNQK (TSHR 287-764), GFGQ (TSHR 365-764) und das Signalpeptid-(TSHR 1-24)-deletierte Konstrukt EDI ( $\Delta$ SP-TSHR 409-764), benannt nach den ersten N-terminalen Aminosäuren, wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus pFLAG-TSHR-GFP generiert und waren daher ebenfalls mit N-terminalem FLAG- und C-terminalem GFP-Tag markiert. Die Konstrukte sind nach den ersten N-terminalen TSHR-Aminosäuren benannt und in Abb. 6 A dargestellt. Die zu behaltenden Teile des TSHR wurden amplifiziert. Dabei wurde durch modifizierte Primer jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt.



Dadurch konnte das Amplifikat in pFLAG-TSHR-GFP an die zuvor eingefügte EcoRI-Schnittstelle kloniert werden, sodass am N-Terminus der trunkierten Konstrukte das Signalpeptid und ein FLAG-Tag vorhanden war. Für die Deletion des Signalpeptids in EDI wurde dieses durch ein Fragment des CMV-Promotors plus FLAG-Tag aus pEGFP-N1 mittels Klonierung über SnaBI und EcoRI ersetzt.

### 2.3.8 Ortsspezifische Mutagenese

Punktmutationen wurden in die cDNA des humanen TSHR (hTSHR) in pSP-FLAG-TSHR-GFP mittels ortsspezifischer Mutagenese (QuikChange-Methode; Weiner *et al.*, 1994) eingeführt. Dazu wurden jeweils in einem 50- $\mu$ l-Ansatz 50 ng Template-DNA (pFLAG-TSHR-GFP) eingesetzt, 10 pmol jedes Primers sowie 10 nmol dNTPs. Es wurden 2,5 U der *Pfu*Turbo-DNA-Polymerase (Agilent) und 5  $\mu$ l des mitgelieferten 10fach-Reaktionspuffers dazugegeben. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler mit dem Programm in Tabelle 1. Die verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.1.9 aufgeführt. Vor der Transformation erfolgte ein Verdau mit DpnI bei 37 °C für 3 Stunden.

**Tabelle 1. PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	1
	95 °C	30 s	16
Annealing	55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	14 min	
finale Elongation	68 °C	20 min	1
Kühlung	12 °C	$\infty$	

### 2.3.9 Klonierung des murinen TSHR

Die cDNA des wildtypischen murinen TSHR (mTSHR) im pSVL-Vektor war ein Geschenk von Dr. Holger Jäschke und Dr. Sandra Huth (Universität Leipzig). mTSHR wurde mittels PCR amplifiziert (Tabelle 2). Dazu wurde in einem 20- $\mu$ l-Ansatz 50 ng Template-DNA (pmTSHR-SVL) eingesetzt, 20 pmol jedes Primers (*forward*-Primer: mTSHR-AfeI-A, *reverse*-Primer: mTSHR-EcoRI-B) sowie 10 nmol dNTPs. Es wurden 5 U der *Opti*Taq-DNA-Polymerase (Robo-klon) und 2  $\mu$ l des mitgelieferten 10fach-Reaktionspuffers (Puffer B) dazugegeben.

Durch die 5'-Überhänge der Primer wurden den mTSHR flankierend eine AfeI- und eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt, über welche der mTSHR in pEGFP-N1 kloniert werden konnte. Auf diese Weise wurde pmTSHR-GFP generiert, das für den mTSHR mit C-terminalem GFP-Tag kodiert.

**Tabelle 2. PCR-Programm für die Amplifikation des murinen TSHR.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	3 min	1
	94°C	30 s	25
Annealing	57°C	1 min	
Elongation	72°C	2,5 min	
finale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	12°C	∞	

### 2.3.10 Generierung der TSHR-FSHR-Chimären mittels restriktionsfreier Klonierung

Für die Chimären wurden die Sequenzen des TSHR und FSHR beiderseits des konservierten Bereichs YPSHCCAF (extrazelluläre Helix) vertauscht, analog zur T3- bzw. F3-Chimäre von Schaarschmidt *et al.*, 2014. Die Chimäre mit der TSHR-LRRD und der FSHR-Hinge/TMD wurde TSHR×FSHR genannt, die Chimäre mit der FSHR-LRRD und der TSHR-Hinge/TMD wurde FSHR×TSHR genannt (Abb. 10).

Die Konstrukte wurden durch restriktionsfreie Klonierung erzeugt (Van Den Ent, Löwe, 2006). Dazu wurde die cDNA der jeweiligen LRRD aus pFLAG-TSHR-GFP bzw. pFSHR-GFP mittels PCR (PCR 1, Tabelle 3) amplifiziert und dabei durch modifizierte Primer Überhänge angefügt, die zum jeweils anderen Vektor komplementär waren. In einer zweiten PCR-Reaktion (PCR 2, Tabelle 3) wurden die so generierten Linearen PCR-Produkte als Megaprimer verwendet und als Template das jeweils andere Plasmid. Die Megaprimer konnten auf diese Weise mit ihren komplementären Enden mit diesem hybridisieren und durch die PCR wurde die gesamte Sequenz für die LRRD durch die des jeweils anderen Rezeptors ersetzt, analog zur QuikChange-Methode. Die sonstigen Bestandteile waren analog zur PCR in Abschnitt 2.3.9 für die PCR 1 bzw. zur ortsspezifischen Mutagenese für die PCR 2.

Die exakten Austauschstellen befanden sich zwischen den Codons für Prolin (TSHR 280, FSHR 272) und Serin (TSHR 281, FSHR 273). In pFSHR-GFP und pFSHR-TSHR-GFP wurde ein N-terminaler FLAG-Tag hinter der Spaltstelle der Signalpeptidase mittels *round-the-horn*-PCR eingefügt (OpenWetWare, 2018). Analog zum Protokoll der ortsspezifischen Mutagenese, jedoch mit 25 Zyklen, wurde mit den Primern FSHR-LRRD-A und FLAGwhole-FSHR-B das gesamte Plasmid linear amplifiziert und durch die Modifikation am FLAGwhole-FSHR-B-Primer eine FLAG-Sequenz insertiert. Die *Pfu*-DNA-Polymerase erzeugte *blunt ends*, die phosphoryliert und anschließend ligiert wurden, um ein zirkuläres DNA-Molekül zu erzeugen. Für die Phosphorylierung wurde das PCR-Produkt aus dem Gel aufgereinigt und in 17 µl Wasser eluiert, mit 2 µl T4-Ligase-Puffer (NEB) und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (NEB) gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert und die DNA wie zuvor beschrieben ligiert und transformiert.

**Tabelle 3. Verwendete Primer und PCR-Programme für die restriktionsfreie Klonierung.**

Schritt <u>PCR 1</u>	Tempe- ratur	Zeit	Zyklen	Konstrukt	PCR	Primer
Denaturierung	95°C	3 min	1	TSHR×FSHR	1	Fvec-TSHRIrrd-A Fvec-TSHRIrrd-B
	95°C	30 s	30		2	200 ng PCR-Produkt
Annealing	55-65°C	30 s		FSHR×TSHR	1	Tvec-FSHRIrrd-A Tvec-FSHRIrrd-B
Elongation	72°C	1 min	2		230 ng PCR-Produkt	
finale Elongation	72°C	10 min		1		
Kühlung	12°C	∞				
<u><b>PCR 2</b></u>						
Denaturierung	95°C	30 s	1			
	95°C	30 s	35			
Annealing	55°C	1 min				
Elongation	72°C	14 min				
finale Elongation	72°C	20 min	1			
Kühlung	12°C	∞				

## 2.4 Zellbiologische Arbeiten

### 2.4.1 Zellkultur

*Human-embryonal-kidney*-(HEK)-293T-Zellen (nachfolgend als HEK-Zellen bezeichnet), die stabil transfizierten HEK-Zelllinien sowie die U2OS-TSHR/ $\beta$ -Arrestin-1-( $\beta$ Arr1)-Zellen wurden in den im Abschnitt 2.1.10 angegebenen Zellkulturmedien im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich trypsiniert und im Verhältnis 1:6 oder 1:8 in frisches Medium aufgenommen. Bei der Aussaat der stabilen Zelllinien für Versuche wurde das jeweilige Selektionsantibiotikum weggelassen. Wenn nicht anders angegeben, war DMEM immer mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung supplementiert. Für U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1-Zellen wurden die entsprechenden Aussaat-Medien nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.4.2 Transiente Transfektion

HEK-Zellen wurden mit DPBS gewaschen, dann trypsiniert und gezählt. Die Zellen wurden in DMEM (s. Abschnitt 2.1.10) ausgesät. Die jeweilige Zellzahl für die verschiedenen Experimente ist in der Tabelle 4 dargestellt. Nach 24 Stunden wurde ein Gemisch aus der zu transfizierenden Plasmid-DNA und Polyethylenimin (PEI)-Lösung (1 mg/ml) in serumfreiem Medium (DMEM GlutaMAX, 1 g/l Glucose) zu den Zellen gegeben. Das Gemisch wurde zuvor wie folgt angesetzt: Die DNA wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur in der Hälfte des serumfreien Mediums inkubiert, PEI in der anderen Hälfte. Dabei wurden 2  $\mu$ g PEI je  $\mu$ g DNA eingesetzt. Anschließend wurde das PEI-Medium mit dem DNA-Medium gemischt und 20 Minuten (RT) inkubiert.

**Tabelle 4. Überblick über verwendete Mengen der Reagenzien für die transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen.** IP, Immunpräzipitation; LSM, *Laser-Scanning*-Mikroskopie; FACS, Durchflusszytometrie; RIA, Radioimmunoassay; PEI, Polyethylenimin.

Experiment:	IP oder stabile HEK-Zellen	LSM	FACS oder RIA
Zellzahl	$8 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
DNA-Menge	6 µg	0,8 µg	0,4 µg
PEI-Lösung (1 mg/ml)	12 µl	1,6 µl	0,8 µl
DNA/PEI-Gemisch	500 µl	100 µl	100 µl
Gefäß	100-mm-Schale	35-mm-Schale	1 Well (24er-Platte)
Endvolumen	10 ml	2 ml	1 ml

### 2.4.3 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

HEK-293T-Zellen wurden, wie in Tabelle 4 angegeben, mit den Plasmiden pSP-FLAG-EcoRI(GIQ)-TSHR-GFP, pSP-FLAG-KNQK-GFP, pSP-FLAG-GFGQ-GFP bzw. pFLAG-ΔSP-EDI-GFP (Abschnitt 2.1.8) transfiziert. Nach vier Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet und in DMEM mit 400 µg/ml G418 aufgenommen (Medium siehe Abschnitt 2.1.10). Anschließend wurde zwei bis drei Wochen zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel (mit 400 µg/ml G418) durchgeführt und tote Zellen durch Waschen mit DPBS entfernt. Die Zellen wurden entsprechend der Zellzahl ggf. in kleinere Gefäße überführt. Die Expression der Konstrukte wurde anhand der GFP-Fluoreszenz mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Abschnitt 2.4.4) überprüft. Nach erneuter Zunahme der Zelldichte wurden die Zellen in größere Gefäße überführt und gesplittet, sodass sie drei 100-mm-Schalen konfluent bewuchsen. Die Zellen wurden trypsinisiert, einmal mit DPBS (1 % FKS) gewaschen und zu  $10^7$  Zellen pro Milliliter in DPBS mit 1 % FKS und 1 mM EDTA aufgenommen. Anschließend wurden mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) am Zell-Sorter  $10^6$  Zellen mit mittlerer GFP-Fluoreszenz (Fluoreszenzintensität 550-2000 Einheiten, ca. 10 % der Zellen) gesammelt. Die Zellen wurden zu  $5 \times 10^5$  Zellen je Well in einer 12-Well-Platte in DMEM zunächst ohne G418 ausgesät. Nach zwei Tagen folgte ein Mediumwechsel bzw. die weitere Kultivierung mit 400 µg/ml G418 und die Zellen wurden für die Versuche bzw. für die Lagerung in flüssigem Stickstoff vermehrt.

### 2.4.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Mittels LSM wurde die zelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine untersucht. HEK-Zellen wurden auf Deckgläsern in 6-Well-Platten ausgesät und transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion bzw. Aussaat bei stabil transfizierten HEK-Zellen wurden die Deckgläser in einer Küvette befestigt und 37°C warmes PBS sowie einige Tropfen 0,025-prozentige (w/v) Trypanblaulösung dazugegeben. Trypanblau fluoresziert als Komplex mit Membranproteinen, dringt jedoch nicht in intakte Zellen ein. Auf diese Weise wurde die Plasmamembran angefärbt. In den LSM-Bildern ist die GFP-Fluoreszenz grün dargestellt und die Trypanblau-Fluoreszenz rot. Befinden sich die GFP-Fusionskonstrukte an der Zellmembran, ist bei Überlagerung der Bilder der beiden Kanäle durch die Kolokalisierung der Fluoreszenzen eine Gelbfärbung festzustellen. Die Zellen wurden

mit dem Objektiv Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC (Carl Zeiss) am ConfoCor2 (Carl Zeiss) mikroskopiert. Die Einstellungen sind in der Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5. Eigenschaften der verwendeten Fluorophore und Einstellungen am LSM.** Wenn nicht anders angegeben, sind die Werte als Wellenlänge  $\lambda$  in Nanometer (nm) zu verstehen. Trypanblau fluoresziert als Komplex mit Proteinen. Die angegebenen Maxima wurden mit Trypanblau (0,02%) in einer 10% BSA-Lösung ermittelt (Avelar-Freitas *et al.*, 2014). Es wurden verschiedene Einstellungen für die Quantifizierung bzw. die Aufnahme von Bildern verwendet. EGFP, *enhanced green fluorescent protein*; BP, Bandpass; LP, Langpass.

	EGFP (GFP)	Trypanblau
Exzitationsmaxima	488	296; 485; 648
Emissionsmaxima	507	483; 660
Anregung	488	545
Filterbandbreite	505 - 530 (BP)	> 560 (LP)
Lochblende	283 $\mu\text{m}$	568 $\mu\text{m}$
Laserintensität	8 %	20 %

#### 2.4.5 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Gesamt-Expression der Rezeptor-Varianten anhand der GFP-Fluoreszenz bestimmt sowie die Zelloberflächen-Expression der Rezeptoren über einen primären Maus-anti-FLAG- oder Maus-anti-TSHR-Antikörper und einen sekundären Ziege-anti-R-Phycoerythrin (PE)-konjugierten Antikörper (s. Abschnitt 2.1.4).

Alle Schritte wurden auf Eis bzw. in einer gekühlten (4 °C) Zentrifuge und mit kalten Puffern durchgeführt. 200000 HEK-Zellen pro Vertiefung einer 24-Well-Platte wurden ausgesät und nach 24 Stunden transient transfiziert. 48 Stunden später wurden sie vom Boden der Wells abgelöst. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen kurz mit EDTA/EGTA-Lösung inkubiert und mit 1 ml FACS-Puffer von der Testplatte abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Es folgte ein Waschschritt mit FACS-Puffer. Nach jedem Waschen wurden die Zellen 5 Minuten bei  $300 \times g$  zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach dem ersten Waschen wurden die Zellen zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 10 Minuten in FACS-Puffer inkubiert, danach abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von jeweils 1:1000 in FACS-Puffer hinzugegeben. Für Rezeptoren ohne *Tag* wurde der anti-TSHR-Antikörper 4C1 (Santa Cruz) verwendet, für Konstrukte mit extrazellulärem FLAG-*Tag* der anti-FLAG-Antikörper M2 (Sigma). Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen, bevor sie 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper (Ziege anti-Maus IgG, PE-konjugiert, 1:50 in FACS-Puffer) inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen wieder dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und danach für die Messung im Durchflusszytometer in 250  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert.

Von 10000 einzelnen Zellen je Konstrukt wurden die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Die Einstellungen am Durchflusszytometer sind in der Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6. Eigenschaften der verwendeten Fluorophore und Einstellungen am Durchflusszytometer FACSCalibur.** Alle Werte sind als Wellenlänge  $\lambda$  in Nanometer (nm) angegeben. EGFP, *enhanced green fluorescent protein*; PE, R-Phycoerythrin; BP, Bandpass.

	EGFP (GFP)	PE
Exzitationsmaxima	488	480; 565
Emissionsmaximum	507	578
Anregung (Argon-Laser)	488	488
Filterbandbreite (BP)	$510 \pm 20$	$585 \pm 42$

Die Auswertung der Daten wurde mithilfe des Programms FCS Express Flow Cytometry vorgenommen. Für die Auswertung von Zellen, die beide Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig enthielten, wurde eine Kompensation durchgeführt. Dafür wurden HEK-Zellen verwendet, die entweder mit TSHR-GFP transfiziert waren und nicht mit Antikörpern gefärbt wurden (nur GFP-Fluoreszenz) oder HEK-Zellen, die mit nicht GFP-markiertem TSHR transfiziert waren und mit Primär- und Sekundärantikörper gefärbt waren (nur PE-Fluoreszenz). Mithilfe der Kompensationsmatrix der Software wurden Koeffizienten generiert, welche die Einstrahlung in den Detektor der jeweils anderen Fluoreszenz rechnerisch entfernen.

Zuerst wurde in einem Punkstreudiagramm (*Dot-Plot*) mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (als Maß für die Größe bzw. Granularität der Zellen) ein Gate definiert, welches außerhalb liegende Werte (z.B. Zelltrümmer) für die weiteren Messungen ausschloss. HEK-Zellen, die mit einem Kontrollvektor (pcDNA3) transfiziert wurden, dienten dazu, in einem weiteren *Dot-Plot* mit Auftragung von PE- gegen GFP-Fluoreszenzintensität, nicht gefärbte bzw. nicht transfizierte Zellen auszuschließen. Dafür wurden Quadranten so gelegt, dass etwa 99 % der Kontrollzellen für beide Fluoreszenzsignale negativ waren. pcDNA3-transfizierte Zellen, welche mit Primär- und Sekundärantikörper gefärbt waren, dienten dazu, ein Ausschluss-Gate für unspezifisch gefärbte Zellen zu legen. Bei der Färbung mittels FLAG-Antikörper wurden dazu mit TSHR-GFP transfizierte Zellen verwendet, die keinen FLAG-Tag enthielten. Für die übersichtliche Darstellung der Mediane und der Streuung der Expression verschiedener Rezeptor-Konstrukte wurden die Werte der Fluoreszenz-Intensität der ausgewählten Zellen exportiert und damit in GraphPad Prism Kastengrafiken (*Box-Plots*) erstellt (Abb. 10 und 14). Für die trunkierten TSHR-Konstrukte sind die Gauss-Mittelwerte (normiert zum wt-TSHR) anstatt der *Box-Plots* dargestellt (Abb. 6 C).

## 2.5 Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.5.1 Immunpräzipitation (IP)

Die IP wurde dazu verwendet, GFP-Fusionsproteine aus dem Zelllysats zu isolieren und zu konzentrieren.

**Vorbereitung der Protein-A-Sepharose-Beads.** 3,5 mg/ml Protein-A-Sepharose (PA-S) in PBS wurden 15 Minuten zum Quellen auf Eis gestellt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei  $700 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde das Pellet vom Überstand befreit und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde die PA-S in der gleichen Konzentration in PBS aufgenommen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder für die IP verwendet.

**Kopplung des präzipitierenden Antikörpers.** 2  $\mu\text{l}$  Stammlösung anti-GFP (GFP02) je 3,5 mg Protein-A-Sepharose wurden mit über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  geschwenkt. Bei diesem Schritt binden die Antikörper mit ihrer Fc-Region an Protein A. Danach wurde die Suspension 2 Minuten bei  $700 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Direkt im Anschluss erfolgte die Kopplung des Lysats.

**Lyse von HEK-Zellen und Antigenkopplung.** Drei Tage nach Aussaat der stabil transfizierten HEK-Zellen wurden diese vom Medium befreit, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysispuffer pro 100-mm-Schale für eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Das Lysat wurde eine Stunde bei  $5000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand auf das Antikörper/PA-S-Pellet gegeben. Dabei wurde das Lysat einer 100-mm-Schale an 3,5 mg Antikörper/PA-S gekoppelt. Zur Kopplung der im Lysat befindlichen Antigene an den Fab-Teil der Antikörper wurde der Ansatz erneut über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert. Die Beads wurden einmal mit Waschpuffer I, dann zweimal mit Waschpuffer II gewaschen (Zentrifugation jeweils 2 Minuten,  $700 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und standen anschließend für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Verfügung.

### 2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die PA-S-Beads wurden mit der Hamiltonpipette komplett trocken gesaugt. Danach wurde das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  SDS-PAGE-Ladepuffer ( $1 \times \text{Roti-Load}$ ) je Lysat einer 100-mm-Schale aufgenommen und 3 Minuten auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Probe wurde danach 4 Minuten bei  $11000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand mit der Hamiltonpipette in ein neues Gefäß überführt bzw. auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

#### Vorbereitung der Gele

Die in der Tabelle 7 aufgeführten Reagenzien wurden der Reihe nach gemischt und unmittelbar nach der Zugabe von APS in die Gelgießvorrichtung gegeben. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde die Isopropanol-Schicht entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm in die Gießvorrichtung eingesteckt.



**Tabelle 7. Lösungen und Puffer für 10-prozentige Polyacrylamid-Gele.** Die Angegebenen Mengen reichen für vier Gele. Die eingesetzten Lösungen und Puffer sind auf Wasser-Basis. AA/Bis-AA, Acrylamid-Bisacrylamid.

	Trenngel	Sammelgel
AA/Bis-AA 30 % (w/v)	7,5 ml	1,67 ml
Trenngelpuffer	11,25 ml	–
Sammelgelpuffer	–	1,25 ml
SDS 20 % (w/v)	113 µl	50 µl
TEMED	11,3 µl	10 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 ml	7 ml
APS 10 % (w/v)	158 µl	50 µl

In jede Geltasche wurden 30 µl des präparierten Proteins gegeben. Dies entsprach dem Lysat von etwa  $12 \times 10^6$  Zellen. Das Gel wurde mit Laufpuffer in der Laufvorrichtung befestigt und die Proteine bei 20 mA pro Gel aufgetrennt.

### 2.5.3 Western Blot

Die Proteine wurden mit dem *Tank-Blot*-Verfahren vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei wurde für 90 Minuten eine konstante Stromstärke von 2,4 mA pro cm<sup>2</sup> Gel aufrechterhalten. Die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran wurden mit Ponceau-Rot-Lösung angefärbt, um den Erfolg des Transfers zu bestätigen.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit TBS entfärbt und eine Stunde in Blockpuffer geschwenkt. Danach wurde der primäre Antikörper in den Blockpuffer gegeben und die Membran darin über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Die Membran wurde dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen und dann eine Stunde in Blockpuffer mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Als sekundärer Antikörper kam mit alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper in einer 1:1000-Verdünnung zum Einsatz. Danach wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen und gebundene Antikörper mit der NBT/BCIP-Färbelösung bis zum Erscheinen immunreaktiver Banden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Verdünnung mit destilliertem Wasser angehalten.

## 2.6 Pharmakologische Arbeiten

### 2.6.1 Radioliganden-Bindungsassay

**Membranpräparation.** In 100-mm-Schalen wurden jeweils  $8 \times 10^6$  HEK-TSHR-Zellen ausgesät. Nach 72 Stunden wurde die Gesamt-Membran präpariert. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend abgeschabt und in 2 ml PBS je Schale aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei  $400 \times g$  und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 2 ml Tris-BAME aufgenommen und im Potter-Elvehjem-Kolben Größe S mit 10 Hüben bei 800 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde 35 Minuten bei  $26000 \times g$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Tris-BAME je Schale



aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay-Kit (ThermoFisher) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Membran wurde bei – 80 °C gelagert.

**Bindung.** Die Membran entsprechend der angegebenen Proteinmenge wurde mit der angegebenen Menge  $^{125}\text{I}$ -bTSH und ggf. zusätzlich kalten Liganden in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  je Ansatz für 2 Stunden bei 25 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Membranen wurden mit einem Harvester-System auf GF/C-Glasfaserfiltern geerntet und fünfmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Radioaktivität des gebundenen  $^{125}\text{I}$ -bTSH im Gammaprobenzähler gemessen.

Zur Abschätzung der Affinität wurde die Inhibitionskonstante  $K_i$  mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Bylund *et al.*, 2004; Cheng, Prusoff, 1973) berechnet:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{F}{K_d}}$$

$F$ ...Konzentration des freien Radioliganden

$K_d$ ...Dissoziationskonstante des Radioliganden

$IC_{50}$ ...Konzentration des Inhibitors bei halbmaximaler Hemmung der spezifischen Bindung

### 2.6.2 cAMP-Radioimmunoassay (RIA)

$2 \times 10^5$  Zellen je Well wurden in Poly-L-Lysin-beschichtete 24-Well-Platten ausgesät. Nicht stabil transfizierte Zellen wurden nach 24 Stunden transient transfiziert (Abschnitt 2.4.2). 72 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen einmal mit Stimulationsmedium gewaschen und anschließend mit den Liganden in den angegebenen Konzentrationen gelöst in Stimulationsmedium behandelt. Die Zellen wurden mit den Liganden 60 Minuten bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und 750  $\mu\text{l}$  eiskaltes Extraktionsmedium hinzugefügt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde das Lysat in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Dann folgte die Trocknung der Proben im Rotationsvakuum-Konzentrator über Nacht. Zum Lösen der Proben wurden die getrockneten Pellets in 750  $\mu\text{l}$  RIA-Vollpuffer aufgenommen, 20 Minuten bei 4 °C gelöst, gevortext und zentrifugiert ( $23000 \times g$ , 4 °C, 15 Minuten). Der Überstand wurde weiter verwendet und in RIA-Vollpuffer verdünnt, um den Messbereich des RIA zu erreichen. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen, wurden die Proben sowie Standard-cAMP-Lösungen bei Raumtemperatur acetyliert (500  $\mu\text{l}$  Probe, 20  $\mu\text{l}$  Acetylierungsreagenz).

Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der Proben, 100  $\mu\text{l}$  RIA-Vollpuffer, 100  $\mu\text{l}$  Tracer ( $^{125}\text{I}$ -cAMP-Tyrosylester; 10000 cpm je Probe) sowie Kaninchen-anti-cAMP-Antiserum in einer 1:160000-Endverdünnung gemischt. Die Ansätze wurden 72 Stunden bei 4 °C inkubiert. Der cAMP-Antikörper-Komplex wurde durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Sac-Cel (Cellulose-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper) und anschließender Inkubation von 40 Minuten bei 4 °C präzipitiert. Die Proben wurden mit 1 ml RIA-Vollpuffer verdünnt und 40 Minuten bei  $4200 \times g$  zentrifugiert. Der

Überstand wurde vollständig entfernt. Die Radioaktivität wurde im Gammaprobenzähler bestimmt. Die Konzentration des nicht radioaktiven cAMP wurde anhand einer Standardkurve im Bereich von 0,2 bis 146 fmol/Probe berechnet.

### 2.6.3 $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierungs-Assay

Die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung zum TSHR wurde in der U2OS-TSHR(L)/ $\beta$ -Arrestin-1-Zelllinie (DiscoverX) mit der *enzyme-fragment-complementation*-Methode gemessen. Bei dieser Methode wird die Komplementierung von  $\beta$ -Galaktosidase-Fragmenten, die an TSHR bzw.  $\beta$ -Arrestin 1 fusioniert sind, mittels Chemilumineszenz quantifiziert. 24 Stunden vor dem Versuch wurden 20000 Zellen je Well in eine weiße 96-Well-Platte (Nunclon) in 90  $\mu$ l AssayComplete Cell Plating 5 Reagenz (DiscoverX) ausgesät. Für die Behandlung der Zellen wurden die Liganden bTSH bzw. S37a in dem gleichen Reagenz gelöst und 10  $\mu$ l zu den Zellen gegeben, um die angegebene Endkonzentration herzustellen. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung mit dem PathHunter Detection Kit (DiscoverX) nach Herstellerangaben quantifiziert. Die Lumineszenz wurde am Plattenleser Infinite F200 Pro (Tecan) gemessen.

### 2.6.4 NFAT-Reportergen-Assay

Stabile HEK-TSHR-Zellen wurden 24 Stunden vor der Aussaat bzw. 48 Stunden vor dem Versuch in einer konfluenten 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro] transient transfiziert. Das Protokoll war analog zu dem im Abschnitt 2.4.2. Abweichend davon wurden 200  $\mu$ l einer Mischung aus 4  $\mu$ g Plasmid-DNA und 8  $\mu$ g PEI in DMEM (high Glucose) in die Flasche (Endvolumen 5 ml) gegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuch in eine weiße 96-Well-Platte (Nunclon) in 50  $\mu$ l DMEM (high Glucose) und 20000 Zellen je Well ausgesät. Für die Behandlung der Zellen wurden die Liganden bTSH bzw. S37a zunächst in phenolrotfreiem DMEM ohne FKS und ohne Penicillin/Streptomycin und mit L-Glutamin (2 mM) gelöst. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und anschließend 50  $\mu$ l der Ligandenverdünungen in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und die Zellen 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Platte 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und die Luciferase-Aktivität mit dem ONE-Glo Luciferase AssaySystem (Promega) nach Herstellerangaben quantifiziert. Die Lumineszenz wurde am Plattenleser Infinite F200 Pro (Tecan) gemessen.

### 2.6.5 Pharmakokinetik-Untersuchungen von S37a

Mit den Pharmakokinetik-Untersuchungen wurde die Pharmacelsus GmbH (Saarbrücken, D) beauftragt. Die Versuche wurden zugelassen und in gemäß den Vorschriften des Landesamts für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen Saarbrücken, durchgeführt. Männliche SWISS-(CD1)-Mäuse (Janvier Labs) wurden bei 20 bis 24 °C in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Futter und Wasser waren frei verfügbar.

**Einmalige Applikation von S37a.** In einer initialen Studie wurde den Mäusen (38 bis 43 g Körpergewicht, KG) einmalig eine niedrige Dosis S37a intravenös (i.v.; 1 mg/kg KG in DMSO/PEG400; 20:80) in die laterale Schwanzvene bzw. oral (p.o.; 10 mg/kg KG in 1 % Tween 80 / 0,5 % Methylcellulose) verabreicht. An sechs Zeitpunkten nach der Applikation wurde Vollblut (Lithium-Heparin) von drei Mäusen je Zeitpunkt durch retrobulbäre Punktion entnommen.

**Wiederholte Applikation.** In einer weiterführenden Studie wurde Mäusen (33 bis 39 g Körpergewicht) p.o. 50, 100 oder 150 mg/kg KG (gleiches Vehikel) täglich über fünf Tage verabreicht. Blut von drei Tieren je Dosierung wurde 15 Minuten und 7 Stunden nach der Applikation am ersten und letzten Tag der Studie entnommen.

**Plasma-Protein-Bindung (PPB).** Gepooltes Plasma (Lithium-Heparin) von männlichen CD-1-Mäusen wurde 60 Minuten bei 37 °C mit 10 µM S37a oder Warfarin inkubiert und anschließend durch Ultrafiltration die freie und an Plasmaproteine gebundene Substanz getrennt. Die gemessenen Konzentrationen im Retentat und Filtrat wurden auf eine nicht filtrierte Stabilitätskontrolle normiert.

In allen Pharmakokinetik-Untersuchungen wurde das Plasma durch 10-minütige Zentrifugation von Vollblut bei 3000 × g (4 °C) gewonnen. Die S37a- bzw. Warfarin-Konzentration im Plasma wurde mittels Flüssigchromatografie-Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt. Die Daten wurden mit der Pharmakokinetik-Software Kinetika 5.0 ausgewertet.

## 2.7 Erstellung der Homologiemodelle

Die TSHR-Homologie-Modelle und die Docking-Position von S37a wurden in der Arbeitsgruppe von Gerd Krause, Annika Kreuchwig, Franziska Witte und Catherine Sargent erstellt und in der Diskussion zur Anschauung verwendet. Die Abbildungen wurden mit Pymol (Schrödinger LLC, 2015) erstellt.

Das Modell der TSHR-Transmembrandomäne (TMD) im inaktiven Zustand wurde mit dem Fragment-basierten Modelling-Server GPCR-SSFE erstellt (Worth *et al.*, 2017). Die Loops wurden mit Hilfe des Servers I-TASSER modelliert (Zhang *et al.*, 2015).

Für das Gesamt-TSHR-Modell wurde das zuvor publizierte Modell der Ektodomäne mit TSH (Kleinau *et al.*, 2013), das auf den FSHR/FSH-Kristallstrukturen (PDB-Codes: 4AY9 und 4MQW; Jiang *et al.*, 2012) basierte, aktualisiert. Das Modell der Ektodomäne enthält auch die extrazelluläre Helix (EH) in der *Hinge*-Region sowie den internen Agonisten. Vor die TMH 1 wurde ein Teil des internen Agonisten an das TMD-Modell angefügt (C<sub>408</sub>EDIMGY), basierend auf der Kristallstruktur eines homologen Sequenzfragments (CENVIGY; PDB-Code: 1DQA). Um die Ektodomäne an die TMD zu docken, wurden die Webanwendungen HADDOCK (van Zundert *et al.*, 2016) und I-TASSER verwendet, wobei als Einschränkung die Disulfid-Brücke zwischen C284 und C408 (Ho *et al.*, 2001) definiert wurde. Die von den Anwendungen am besten bewerteten *Docking*-Positionen wurden verglichen und diejenige für die weitere Verwendung ausgewählt, die mit beiden Anwendungen eine identische Konfiguration vorhersagte.

Die Kristallstruktur von S37a wurde in das TMD-Modell im inaktiven Zustand mit Hilfe des Moduls „Glide“ der Modellierungs-Software Maestro 11 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) gedockt.

### 3 Ergebnisse

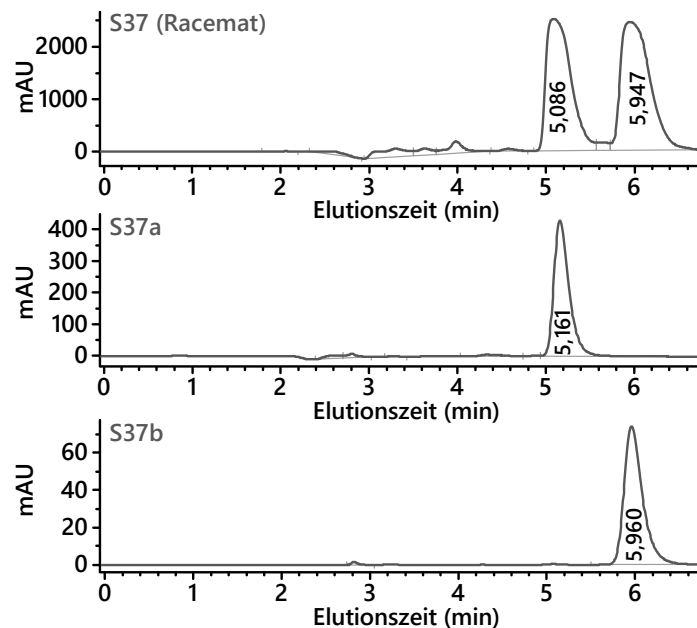
#### 3.1 Enantiomerentrennung von S37 und Strukturaufklärung des aktiven Enantiomers S37a

Zu Beginn der Arbeit lag S37 als Racemat vor. Für Untersuchungen zur molekularen Interaktion von S37 mit dem TSHR war es wichtig, die Wirkung und Struktur der einzelnen Enantiomere zu unterscheiden.

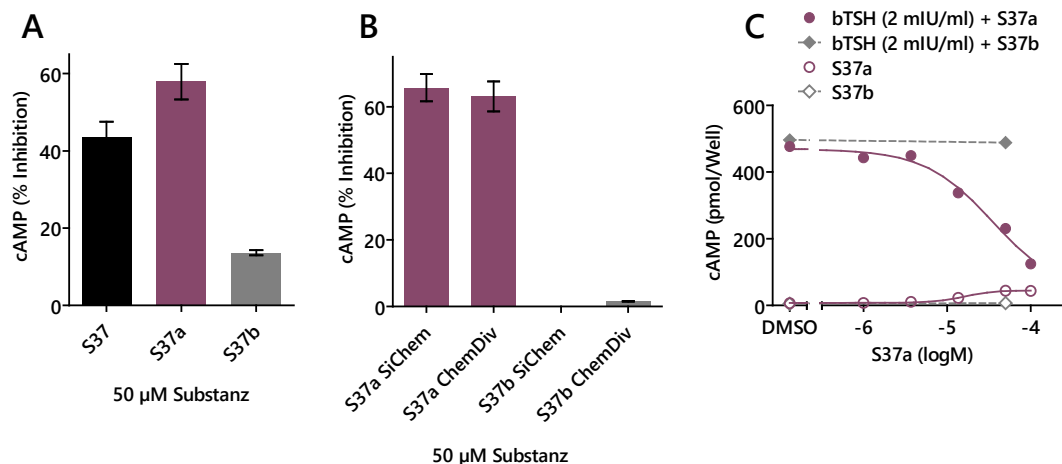
Die beiden Enantiomere von S37 wurden zunächst mittels chiraler Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC) getrennt. Das erste Enantiomer, das nach 5,0 bis 5,4 Minuten eluierte, wurde S37a genannt und das zweite, welches nach 5,8 bis 6,4 Minuten eluierte, S37b (Abb. 3). Die Enantiomere wurden an der analytischen HPLC in 13 Läufen manuell getrennt, um eine ausreichende Menge für spätere funktionelle Versuche zu gewinnen. Die einzelnen Eluate wurden vor der Vereinigung auf ihre Enantiomerenreinheit überprüft. Zwei Beispiele sind in Abb. 3 dargestellt.

Für die funktionelle Charakterisierung der so getrennten Enantiomere wurden stabil transfierte HEK-TSHR-Zellen mit bovinem TSH (bTSH) aktiviert und mit S37 bzw. den Enantiomeren inhibiert. Abb. 4 A zeigt die Inhibition der intrazellulären Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bei einer Substanzkonzentration von 50  $\mu$ M. S37a inhibierte mit 60 % den TSHR stärker, als das Racemat, während S37b nur schwache antagonistische Aktivität zeigte. Später wurden zwei Firmen mit der Synthese bzw. Trennung der Enantiomere mittels präparativer HPLC beauftragt. Die Wiederholung des Versuches ergab vergleichbare Werte für S37a. S37b hingegen zeigte keine Aktivität am TSHR (Abb. 4 B und C), wahrscheinlich aufgrund einer saubereren Trennung, als es an der analytischen HPLC-Anlage möglich war, die nicht für präparative Zwecke ausgelegt war.

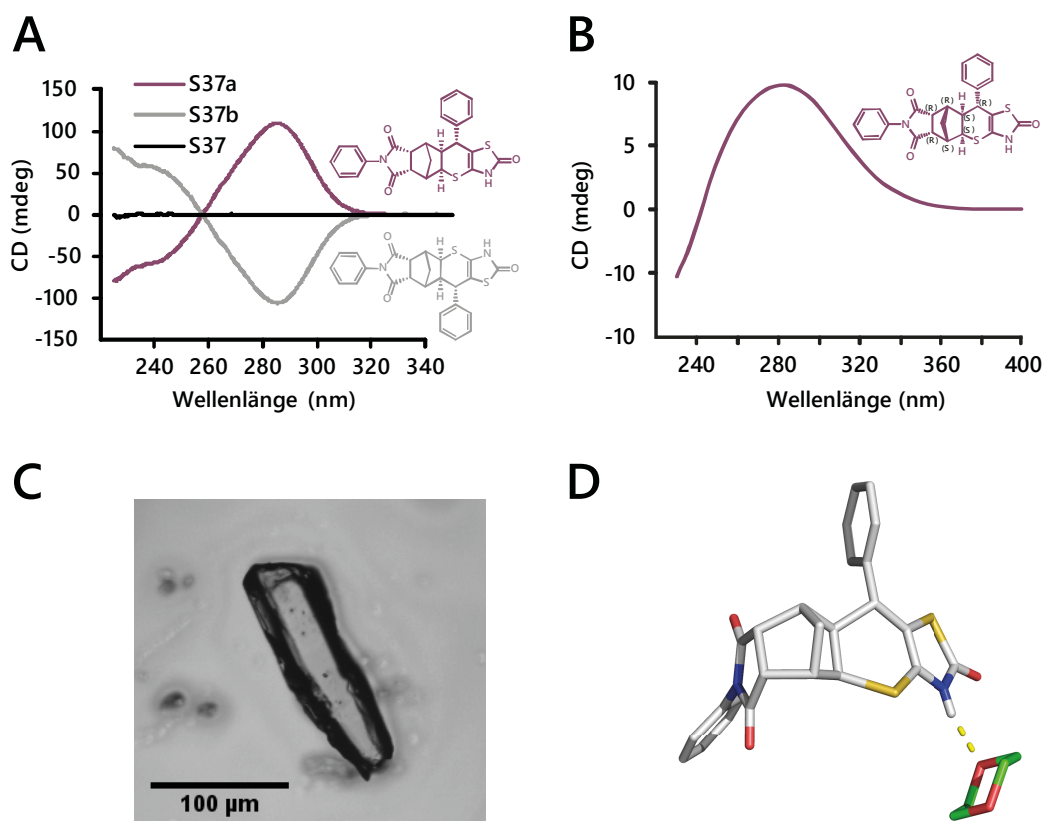
Die Zuordnung der Enantiomere zur Konfiguration erfolgte mittels Zirkulardichroismus-(CD)-Spektroskopie und Dichtefunktionaltheorie-(DFT)-Vorhersage (Abb. 5 A und B). Die aufgenommenen CD-Spektren von S37a und b waren erwartungsgemäß spiegelbildlich. Die DFT-Vorhersage für die Konfiguration mit den in Abb. 5 B gezeigten Stereozentren ergab positive Elliptizität bei Wellenlängen von 260 bis 320 nm, was dem gemessenen CD-Spektrum der aktiven Substanz S37a entspricht. Nachdem es gelungen war, S37a in 1,4-Dioxan zu kristallisieren (Abb. 5 C), wurde die Struktur mittels Röntgenkristallographie bestätigt (Abb. 5 D). Zudem wurde dadurch geklärt, dass der Thiopyranring (zumindest im Kristall) als Wannenkonformation vorliegt und entsprechend der daran gebundene Phenylrest äquatorial zu diesem steht.



**Abb. 3. Chirale Trennung der S37-Enantiomere.** Das Racemat S37 wurde zunächst mittels chiraler *reversed phase* Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) aufgetrennt (oben). Im Anschluss wurde die Reinheit der Enantiomere S37a und S37b bestätigt (Mitte und unten). Zur Trennung wurden 100 µl pro Lauf injiziert, zur Bestätigung 10 µl des Eluats. S37b war aufgrund der längeren Auffangzeit geringer konzentriert. Es ist jeweils ein repräsentatives von 13 Chromatogrammen dargestellt.



**Abb. 4. Funktionelle Charakterisierung der S37-Enantiomere.** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit bTSH und S37 bzw. S37-Enantiomeren behandelt. Die intrazelluläre cAMP-Akkumulation wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt. **A, B:** Antagonistische Aktivität in % Inhibition des durch bTSH induzierten Maximaleffekts. **A:** Aktivität der am FMP separierten Enantiomere. S37a ist der aktive Bestandteil des Racemats, S37b inhibiert den TSHR kaum. **B:** Verifizierung der verschiedenen Auftragssynthesen. Der Effekt von S37a auf den TSHR ist identisch. S37b zeigt keine Inhibition. **C:** Konzentrations-Wirkungskurven von S37a mit bTSH-Stimulation (antagonistischer Effekt) und ohne TSH (agonistischer Effekt) im Vergleich zu 50 µM S37b. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung von Doppel- (B, C) oder Dreifachbestimmungen (A) angegeben.



**Abb. 5. Identifizierung der absoluten Konfiguration von S37a.** Die gemessenen Zirkulardichroismus-(CD)-Spektren (A), angegeben als Elliptizität (CD) in millidegree (mdeg) in Abhängigkeit von der Wellenlänge, für die S37-Enantiomere waren erwartungsgemäß spiegelbildlich. Das mittels zeitabhängiger Dichtefunktionaltheorie errechnete CD-Spektrum (B) für die Struktur mit den angegebenen Stereozentren entsprach dem gemessenen Spektrum von S37a mit positiver Elliptizität zwischen 260 und 320 nm. Nach erfolgreicher Kristallisation von S37a in 1,4-Dioxan (C) konnte die absolute Konfiguration des aktiven Enantiomers röntgenkristallographisch bestätigt werden: D zeigt die 3D-Struktur von S37a (grau) und des Lösungsmittelmoleküls 1,4-Dioxan (grün) verbunden über eine Wasserstoffbrücke (gelb gestrichelt).

## 3.2 Ligand-Rezeptor-Interaktion von S37(a) und TSHR

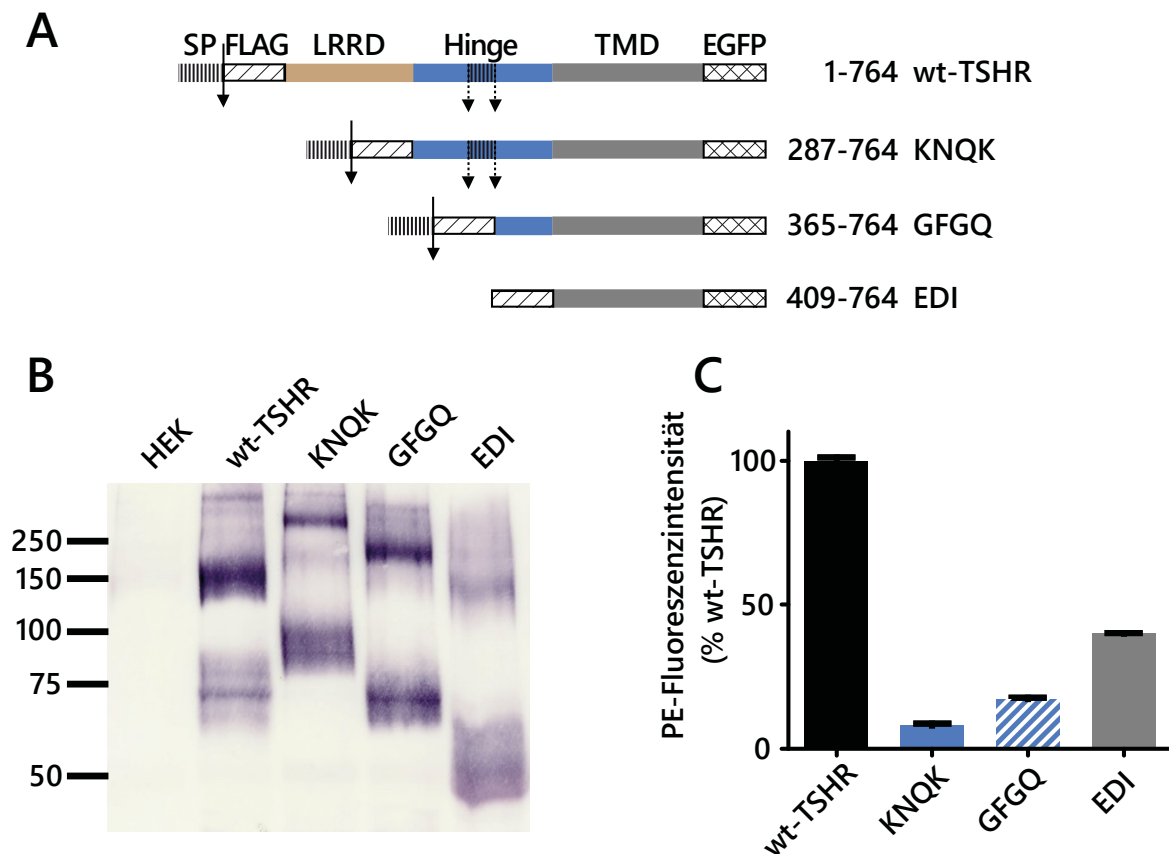
### 3.2.1 Trunkierte TSHR-Konstrukte zur Eingrenzung der Bindungsstelle von S37

Mit dem Ziel, die Bindungsstelle von S37 bzw. S37a einzugrenzen, wurden drei N-terminal trun-kierte TSHR-Konstrukte analog zu Konstrukten aus früheren Publikationen generiert (Neu-mann *et al.*, 2009; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002). Dem Konstrukt mit der ersten Trunkierung  $\Delta 25$ -286-TSHR (beginnend mit K287, nachfolgend **KNQK** genannt) fehlt die LRRD, es enthält aber die extrazelluläre *Hinge*-Region nach der extrazellulären Helix (EH). Das Konstrukt mit der zweiten Trunkierung  $\Delta 25$ -364-TSHR (beginnend mit G365, nachfolgend **GFGQ** genannt) ent-hält nur die zweite Hälfte der *Hinge*-Region nach dem C-Peptid und wie KNQK auch den inter-nen Agonisten. Das kürzeste Konstrukt  $\Delta 1$ -408-TSHR (beginnend mit E409, nachfolgend **EDI** genannt) besteht aus der Transmembrandomäne (TMD) ohne Ektodomäne und enthält im Ge-gensatz zu dem früher publizierten Konstrukt beginnend mit K415 (genannt KFLR, Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002) sechs zusätzliche Aminosäuren, um den Hauptteil des internen Agonisten abzubilden. Alle Konstrukte waren am extrazellulären N-Terminus mit einem FLAG-Tag und am intrazellulären C-Terminus mit einem GFP-Tag versehen (Abb. 6 A).

Die Klonierung und transiente Expression der trunkierten TSHR-Konstrukte in HEK-Zellen wurde in der vorangegangenen Masterarbeit beschrieben (Marcinkowski, 2015). Für die vorliegende Arbeit wurden zusätzlich HEK-Zelllinien mit stabiler Expression der Konstrukte generiert, welche vor allem für die bessere Reproduzierbarkeit besonders empfindlicher cAMP-Messungen der Basalaktivität und für Wettbewerbstudien eingesetzt wurden. Die trunkierten TSHR waren in den stabil transfizierten Zellen untereinander vergleichbar stark exprimiert und translatiert (Abb. 6 B), jedoch wesentlich geringer an der Zelloberfläche lokalisiert, als der wt-TSHR (Abb. 6 C). Die mittels Durchflusszytometrie gemessene Rezeptormenge an der Plasmamembran stieg von 8 % beim längsten Konstrukt KNQK bis 40 % beim kürzesten Konstrukt EDI an. In der Abb. 6 B kann man bei 75 kDa gut erkennen, dass GFGQ etwa dem C-terminalen Spaltprodukt des wt-TSHR entspricht, welches ebenfalls detektiert wurde (B-Untereinheit; Rapoport, McLachlan, 2016). Die höheren Banden über 100 kDa bei den trunkierten TSHR sind möglicherweise Artefakte aufgrund nicht vollständig aufgelöster Aggregate im Zelllysate.

Wahrscheinlich geht die geringere Plasmamembran-Expression der trunkierten Konstrukte mit der Akkumulation intrazellulärer Aggregate einher, welche aufgrund verstärkter Fehlfaltung durch das Qualitäts-Kontrollsystem des frühen sekretorischen Weges in den Zellen erkannt werden. Durch die hohe Sensitivität des Radioimmunoassays (RIA) konnte trotz der teilweise geringen Rezeptormenge an der Plasmamembran für alle Konstrukte die weitere funktionelle Charakterisierung durchgeführt werden.

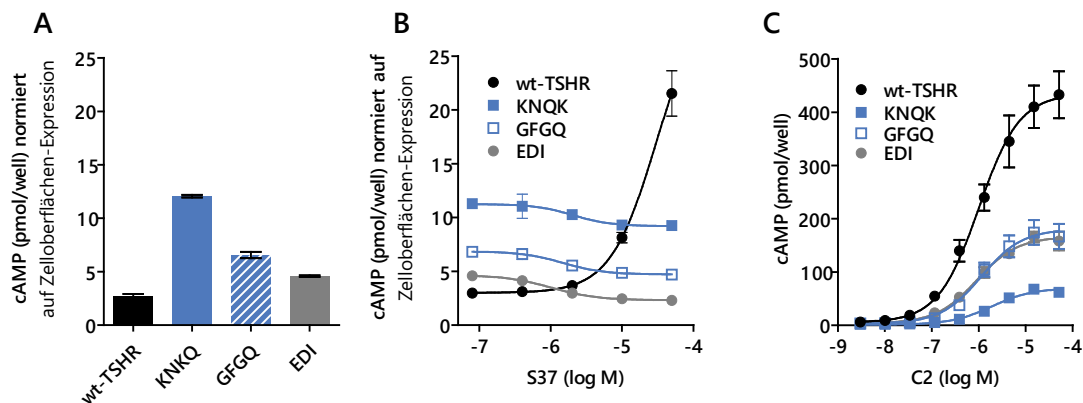




**Abb. 6. Trunkierte TSHR und deren Expression in HEK-Zellen.** **A:** Lineares Schema des wt-TSHR bzw. der trunkierten Konstrukte. Alle Konstrukte enthielten einen N-terminalen FLAG-Tag hinter der Schnittstelle der Signalpeptidase und einen C-terminalen GFP-Tag (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP). Rechts neben den Konstrukten stehen die enthaltenen Nummern der wt-TSHR-Aminosäuren und die Namen der Konstrukte entsprechend den ersten N-terminalen Aminosäuren. EDI enthielt kein Signalpeptid, weil die erste Transmembranhelix als Signalankersequenz fungieren kann. **B:** Western-Blot der trunkierten TSHR nach Immunpräzipitation (IP) des Lysats stabil exprimierender HEK-Zellen. Je Spur wurde  $\frac{1}{3}$  einer konfluenten 100-mm-Zellkulturschale ( $13 \times 10^6$  Zellen) aufgetragen. Die IP- und Western-Blot-Antikörper waren gegen GFP gerichtet. Die Konstrukte haben inklusive der Tags eine prognostizierte Masse von 142 kDa (wt-TSHR + 6 Glykosylierungen), 85 kDa (KNQK, einmal glykosyliert), 75 kDa (GFGQ) und 68 kDa (EDI). **C:** Durchflusszytometrische Messung der Zelloberflächenrezeptoren. Stabil transfizierte HEK-Zellen wurden mit einem primären Maus-anti-FLAG-Antikörper und einem sekundären R-Phycoerythrin-(PE)-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Die Säulen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten.

Die trunkierten TSHR hatten eine erhöhte basale (konstitutive) Aktivität, was bisherige Ergebnisse von Vlaeminck-Guillem *et al.* (2002) bestätigt (Abb. 7 A). Während S37 im wt-TSHR ein schwacher partieller Agonist war, fehlte diese Eigenschaft in allen verkürzten TSHR vollständig (Abb. 7 B); stattdessen war die Substanz hier ein inverser Agonist.

Da die Konstrukte ohne vollständige Ektodomäne nicht von TSH aktiviert werden können (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002), war es für nachfolgende Inhibitionsstudien notwendig, diese mit einem Agonisten zu aktivieren, der an der TMD bindet. Alle trunkierten TSHR konnten mit dem niedermolekularen allosterischen Agonisten C2 aktiviert werden (Abb. 7 C). Die  $EC_{50}$  betrug  $2 \mu\text{M}$  für KNQK und  $1 \mu\text{M}$  für alle anderen Konstrukte und den wt-TSHR. Dies beweist die Funktionalität der verkürzten Konstrukte im Hinblick auf die  $G_s$ -Aktivierung und die Existenz einer allosterischen Bindungstasche für C2 in der TMD, wie es auch beim ähnlichen Konstrukt KFLR beschrieben wurde (Neumann *et al.*, 2009).

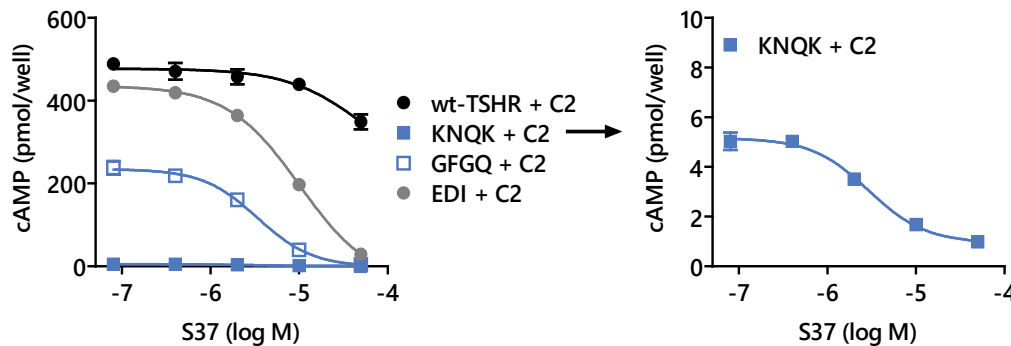


**Abb. 7. Funktionelle Charakterisierung der trunkierten TSHR-Konstrukte.** Basale cAMP-Akkumulation (A) und konzentrationsabhängiger Effekt von S37 allein (B) in HEK-Zellen mit stabiler Expression der trunkierten Konstrukte normiert auf die durch FACS ermittelte Zellmembran-Expression. S37 zeigte eine schwach positive intrinsische Wirkung ( $E_{max}$ ) auf den TSHR. Dieser Effekt fehlte in den verkürzten Konstrukten. Stattdessen wirkte es als inverser Agonist. C: Konzentrationsabhängige Aktivierung der trunkierten TSHR durch den Agonist C2 in transient transfizierten HEK-Zellen (nicht normiert). Die Daten sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppel- (A, B) und Vierfachbestimmungen (C).

Da vorherige Versuche mit dem gesamten TSHR einen kompetitiven Antagonismus von S37 zum Hormon bTSH zeigten (Abb. 2 B), erschien es möglich, dass S37 nicht an der TMD bindet (Hoyer, 2014). Abb. 7 B deutete jedoch bereits darauf hin, dass S37 auch in den trunkierten TSHR einen Effekt aufweist. Da es möglich war, die trunkierten TSHR ohne Ektodomäne mit C2 zu aktivieren, wurde nun zusätzlich S37 hinzugegeben, um den ggf. vorhandenen antagonistischen Effekt zu untersuchen (Abb. 8). Die verkürzten Konstrukte, auch EDI, welches nur die TSHR-TMD enthält, wurden stark inhibiert, was deutlich zeigt, dass S37 an der TMD des TSHR bindet. Interessanterweise hatte S37 einen stärkeren maximalen antagonistischen Effekt auf die trunkierten TSHR, als auf den wt-TSHR. Dort wurde die C2-induzierte cAMP-Akkumulation in den stabil transfizierten HEK-Zellen um 25 % bei 50  $\mu$ M S37 gehemmt. In den Zelllinien mit den trunkierten TSHR hingegen war die cAMP-Signaltransduktion bei 50  $\mu$ M S37 fast komplett inhibiert. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) lag bei 3  $\mu$ M für KNQK und GFGQ, welche noch die *Hinge*-Region bzw. einen Teil davon enthielten und bei 10  $\mu$ M für EDI ohne Ektodomäne, während die  $IC_{50}$  von S37 für den wt-TSHR (bei Aktivierung mit C2) über 50  $\mu$ M lag. KNQK wurde in der stabilen Zelllinie nur geringfügig von C2 aktiviert, was mit der geringen Rezeptormenge an der Plasmamembran (Abb. 6 C) zu erklären ist, daher die vergrößerte Darstellung des Graphen in der Abb. 8 rechts.

Aus den Ergebnissen lässt sich Folgendes schlussfolgern: 1.) Die TSHR-Ektodomäne ist entscheidend für die Bindung von S37, weil auch in EDI ohne Ektodomäne die C2-induzierte Aktivierung durch S37 inhibiert wurde. 2.) Die Ektodomäne scheint einen erheblichen Effekt auf die Funktionsweise von S37 zu haben, weil die Konstrukte mit verkürzter oder ohne Ektodomäne im Gegensatz zum Gesamt-TSHR nicht von S37 allein aktiviert werden (Abb. 7 B). 3.) Nach Aktivierung durch TSH werden die trunkierten Konstrukte stärker inhibiert als der wt-TSHR

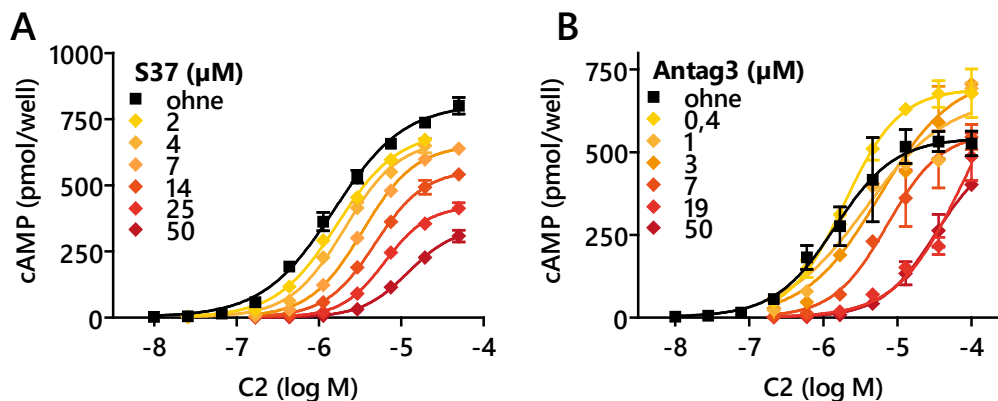
(Abb. 8), was wahrscheinlich ebenfalls auf die fehlende Interaktion von S37 mit der TSHR-Ekto-domäne zurückzuführen ist. Dies wird besonders deutlich im Vergleich mit C2, welches ähnliche  $EC_{50}$  in allen Konstrukten und im Wildtyp aufweist.



**Abb. 8. Die trunkierten TSHR werden von S37 inhibiert.** cAMP-Akkumulation in stabil transfizierten HEK-Zellen nach Aktivierung mit 3  $\mu$ M C2 und konzentrationsabhängiger Inhibition mit S37. Die trunkierten Konstrukte wurden stärker und mit niedrigerer  $EC_{50}$  inhibiert, als wt-TSHR. Die Datenpunkte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten.

Da die Bindung von S37 an der Transmembrandomäne bestätigt wurde, dort jedoch nur für die Bindungstasche von C2 Liganden bekannt sind, war es nicht klar, wo S37 an der TMD binden könnte, denn zuvor wurde am Gesamt-TSHR beschrieben, dass S37 nichtkompetitiv zu C2 wirkt (Abb. 2 B; Hoyer, 2014). Wegen der komplexen Interaktion zwischen der TSHR-Ekto-domäne und -TMD bestand die Möglichkeit, dass dieses Ergebnis ein Artefakt ist und S37 doch in derselben Bindungstasche bindet, wie C2. Daher war es von Interesse, herauszufinden, ob sich der kompetitive Antagonismus von S37 zu C2 im kürzesten trunkierten TSHR (EDI), welches nur die TMD enthielt, bestätigen ließ. Tatsächlich inhibierte S37 die durch C2-induzierte cAMP-Bildung in EDI ebenfalls nichtkompetitiv (abnehmende Maximalwerte bei steigender C2-Konzentration, Abb. 9 A), das heißt hohe C2-Konzentrationen waren nicht in der Lage, den Antagonismus von S37 vollständig aufzuheben. Folglich muss S37 an einer anderen Stelle der TSHR-TMD binden, als C2.

Um die Validität dieses Experimentes zu überprüfen, wurde es mit Antag3 als Antagonist anstelle von S37 wiederholt. Antag3 ist ein Derivat von C2 (Neumann *et al.*, 2014) und daher am TSHR voraussichtlich kompetitiv zu diesem. Erwartungsgemäß wurde ein kompetitiver Antagonismus identifiziert (hauptsächlich Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve, Abb. 9 B).

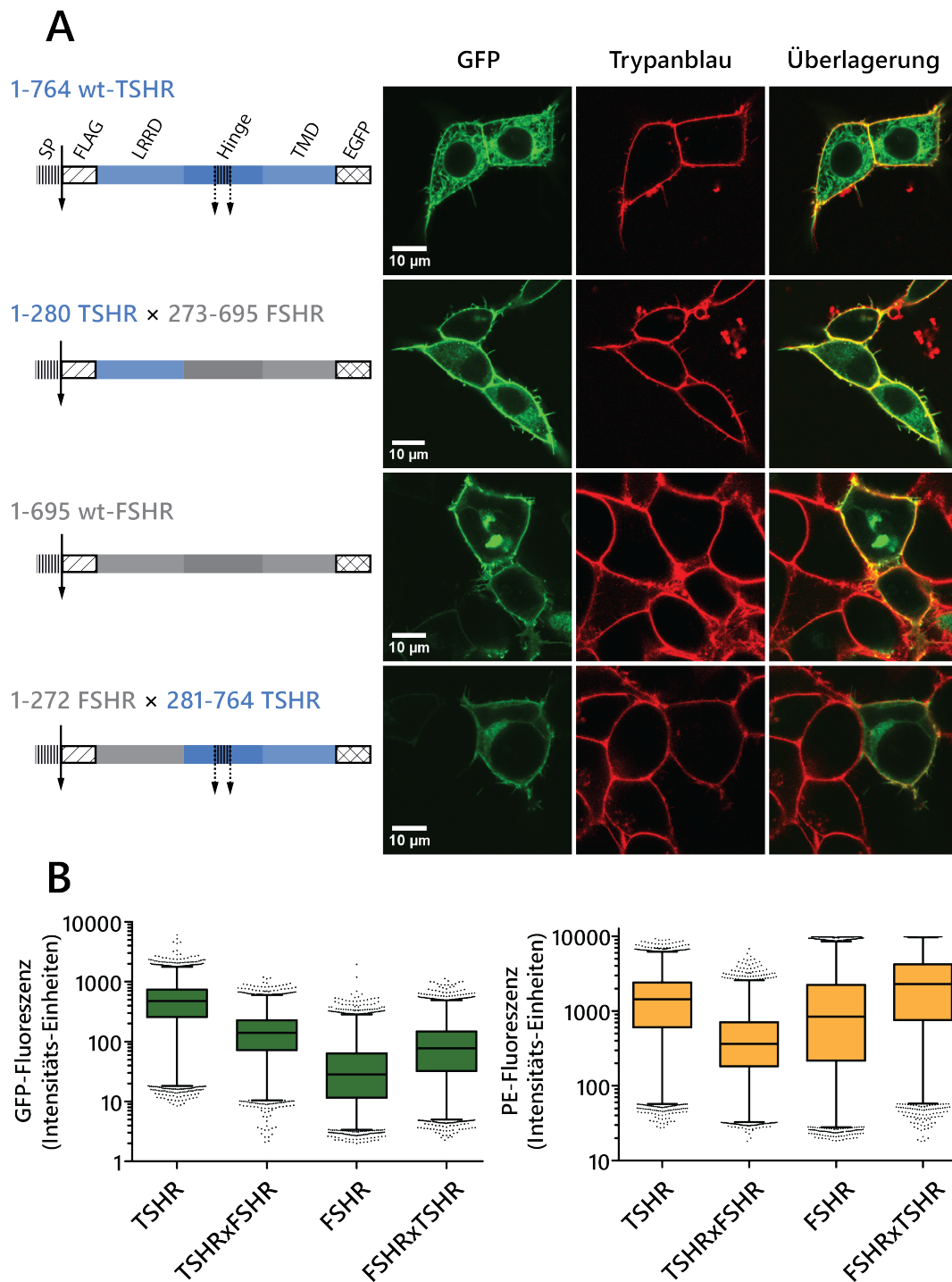


**Abb. 9. S37 ist ein nichtkompetitiver Antagonist von C2 an der Transmembrandomäne (TMD) des TSHR.** HEK-Zellen mit stabiler Expression von EDI (TSHR 409-764, entspricht der TSHR-TMD) wurden mit dem Agonisten C2 konzentrationsabhängig aktiviert und mit ansteigenden Konzentrationen der Antagonisten S37 (A) und Antag3 (B) behandelt. Die Datenpunkte zeigen die cAMP-Akkumulation, gemessen im Radioimmunoassay, als Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten. A: Der Maximaleffekt ( $E_{max}$ ) war verringert, das heißt S37 wirkt nichtkompetitiv zu C2. B: Der  $E_{max}$  wird erreicht. Die C2-Konzentrations-Wirkungskurven waren bei höheren Antag3-Konzentrationen rechtsverschoben. Es liegt ein kompetitiver Antagonismus vor. Bis 1  $\mu$ M Antag3 war der  $E_{max}$  erhöht, was außerdem für einen synergistischen Effekt der Liganden spricht.

### 3.2.2 TSHR-FSHR-Chimären bestätigen die Bindung von S37a an der Transmembrandomäne des TSHR mit einem anderen Ansatz

Die cAMP-Messungen an den trunkierten TSHR-Konstrukten zeigten, dass das Racemat S37 an der TMD die Aktivierung durch C2 nichtkompetitiv inhibierte. In diesem künstlichen Versuchsaufbau war einerseits nicht der gesamte Rezeptor mit LRRD konstituiert, außerdem konnte dadurch bedingt nicht der natürliche Ligand TSH als Agonist eingesetzt werden. Die Publikation von Schaarschmidt *et al.*, 2014, gab Anlass, die Bindungsregion von S37 an TSHR-FSHR-Chimären zu verifizieren, welche jeweils die LRRD des einen und die *Hinge*-Region und TMD des anderen Rezeptors enthielten. Die Funktionalität dieser Konstrukte aus den beiden stark homologen Glykoproteinhormon-Rezeptoren (GPHR) wurde dort nachgewiesen. Da S37 und S37a selektiv nur den TSHR inhibieren (Hoyer, 2014 und Abschnitt 3.4.2), sollte nur die Chimäre inhibiert werden, welche die TSHR-Bindungsregion von S37a enthält.

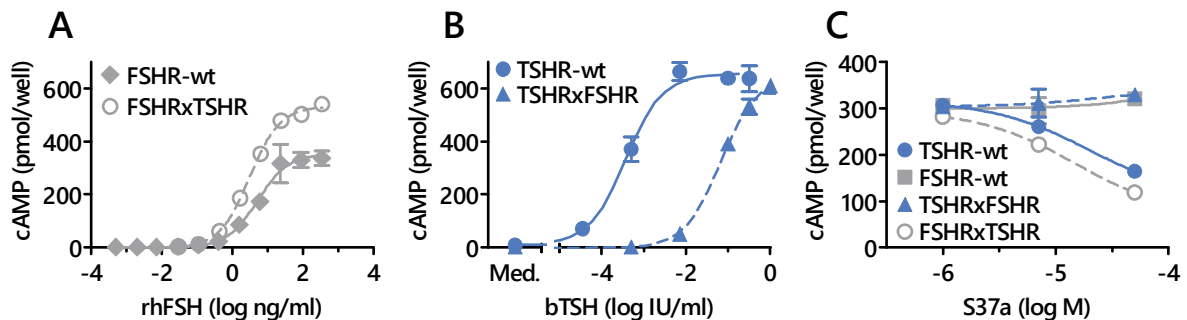
Zunächst wurden die GFP- und FLAG-markierten Chimären auf ihre Expression in HEK-Zellen überprüft (Abb. 10). Die LSM-Aufnahmen (Abb. 10 A) und Durchflusszytometrie-Messungen (Abb. 10 B) zeigen anhand der GFP-Fluoreszenz, dass alle Konstrukte exprimiert wurden. Die Rezeptormenge in der gesamten Zelle und an der Plasmamembran erschien in den durch LSM untersuchten Zellen, die mit der FSHR×TSHR-Chimäre (FSHR-LRRD, TSHR-*Hinge*/TMD) transfiziert wurden, schwächer als bei den anderen Konstrukten. Bei der Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie erwies sich jedoch nur die Gesamtexpression als verringert im Vergleich zum wt-TSHR, und zwar bei allen Chimären und dem wt-FSHR. Die Rezeptormenge an der Zelloberfläche war nur bei TSHR×FSHR (TSHR-LRRD, FSHR-*Hinge*/TMD) verringert und bei FSHR×TSHR sogar höher, als in den wt-Rezeptoren.



**Abb. 10. TSHR-FSHR-Chimären und deren Expression in transient transfizierten HEK-Zellen.** **A:** Schematische Darstellung der TSHR-FSHR-Chimären mit den zugehörigen konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskopie*-(LSM)-Aufnahmen. TSHR-Anteile der chimären Konstrukte sind blau und FSHR-Anteile grau dargestellt. Der Wechsel zwischen beiden Rezeptoren liegt in der in beiden Rezeptoren konservierten Region am Übergang der LRRD zur *Hinge*-Region, analog zum T3- bzw. F3-Konstrukt von Schaarschmidt *et al.*, 2014. Die enthaltenen Aminosäure-Positionen sind angegeben. Alle Konstrukte enthielten einen N-terminalen FLAG-Tag hinter der Schnittstelle der Signalpeptidase und einen C-terminalen GFP-Tag (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP). Die LSM-Bilder zeigen die Fluoreszenz der GFP-markierten Rezeptorkonstrukte in grüner Farbe, die mit Trypanblau gefärbten Plasmamembranen rot. In der Überlagerung beider Kanäle zeigt eine Gelbfärbung die Kolokalisierung beider Fluoreszenzen an der Plasmamembran an. **B:** Bestimmung der Expression mittels Durchflusszytometrie normiert auf den wt-TSHR. Die GFP-Fluoreszenz (links, grün) zeigt die Gesamtexpression an. Die HEK-Zellen wurden mit einem primären Maus-anti-FLAG-Antikörper und einem sekundären R-Phycoerythrin-(PE)-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Die PE-Fluoreszenz entspricht der Menge der Zelloberflächen-Rezeptoren. Die Daten sind als repräsentative *Box-Plots* eines von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Duplikate durchgeführt wurden, angegeben.



Zunächst wurden die Chimären mit FSH bzw. TSH behandelt, um deren Funktionalität zu überprüfen (Abb. 11 A, B). Anhand der Kurven wurde jeweils die Hormonkonzentration bei 80-prozentiger Maximalaktivität ( $EC_{80}$ ) errechnet. Sie betrug für rhFSH 21 ng/ml beim wt-FSHR und 12 ng/ml bei der FSHR-LRRD-TSHR-Chimäre (FSHR $\times$ TSHR). Beim wt-TSHR betrug die  $EC_{80}$  für bTSH 1,5 mIU/ml, war jedoch bei der TSHR-LRRD-FSHR-Chimäre mit rund 270 mIU/ml stark erhöht.



**Abb. 11. Nur die FSHR-TSHR-Chimäre mit TSHR-Hinge/TMD wird wie wt-TSHR von S37a inhibiert.** HEK-Zellen wurden transient mit den TSHR-FSHR-Chimären transfiziert und mit dem entsprechenden LRRD-bindenden Hormon behandelt (FSHR-LRRD enthaltende Rezeptorkonstrukte mit rhFSH (A, grau), TSHR-LRRD enthaltende mit bTSH (B, blau)). Die cAMP-Akkumulation wurde mit allen Konstrukten aktiviert (Vergleich Schaarschmidt *et al.*, 2014). C: Die Chimären wurden mit der jeweiligen  $EC_{80}$  rhFSH (grau) und bTSH (blau) aktiviert und gleichzeitig mit S37a konzentrationsabhängig inhibiert. S37a ist TSHR-selektiv, inhibiert also nicht den FSHR (Marcinkowski *et al.*, 2019). Die Chimäre, welche die S37a-Bindungsregion am TSHR enthält, sollte inhibiert werden. S37a inhibierte nur die FSHR-LRRD/TSHR-Chimäre, nicht jedoch die entgegengesetzte, was bedeutet, dass die Substanz nicht an der LRRD des TSHR, sondern an der Hinge-Region und/oder der LRRD des TSHR binden muss. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten dargestellt.

Die Rezeptoren wurden anschließend mit der jeweiligen  $EC_{80}$  des Hormons und steigenden Konzentrationen des Antagonisten S37a behandelt. In Abb. 11 C wird deutlich, dass nur die Chimäre von S37a inhibiert wurde, welche die Hinge-Region und TMD des TSHR enthielt. Die Chimäre mit der TSHR-LRRD/FSHR-Hinge-TMD wurde wie der FSHR nicht von S37a inhibiert. Das bestätigt einerseits, dass die Bindungsstelle von S37a im TMD-Bereich liegt, bedeutet aber auch, dass die LRRD des TSHR nicht notwendig für den antagonistischen Effekt von S37a auf die TSHR-induzierte cAMP-Bildung ist.

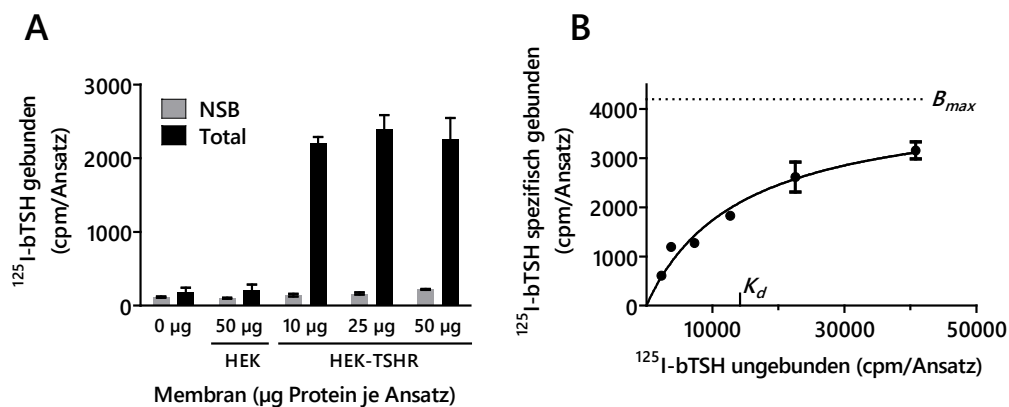
### 3.2.3 S37a verhindert die Bindung von bTSH nicht

Die obigen Untersuchungen an trunkierten TSHR-Konstrukten (Abb. 9) und TSHR-FSHR-Chimären (Abb. 11) legen nahe, dass S37 bzw. das aktive Enantiomer S37a an der Transmembrandomäne des TSHR bindet und die LRRD und Hinge-Region für dessen antagonistische Wirkung nicht erforderlich sind. Vorherige Untersuchungen zur Kompetitivität von S37 im wt-TSHR zeigten jedoch bezüglich der cAMP-Signaltransduktion einen kompetitiven Antagonismus von S37 zum Hormon TSH, welches an der LRRD und Hinge-Region bindet (Abb. 2; Hoyer, 2014).

Mithilfe eines Bindungsassays sollte nachgewiesen werden, ob S37a tatsächlich in der Lage ist, TSH vom Rezeptor zu verdrängen. Dazu wurde ein Radioliganden-Bindungsassay mit radioaktiv markiertem bTSH ( $^{125}$ I-bTSH) etabliert (Abb. 12). Zunächst wurden HEK-TSHR-Membra-

nen in drei Proteinkonzentrationen ausgetestet (Abb. 12 A). Alle zeigten eine deutliche spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -bTSH. Aufgrund der geringsten unspezifischen Bindung wurde die Proteinkonzentration 10  $\mu\text{g}$ /Ansatz für die weiteren Versuche ausgewählt. Membranen von nicht transfizierten HEK-Zellen zeigten nur geringfügige und keine spezifische Bindung von  $^{125}\text{I}$ -bTSH, vergleichbar mit den Ansätzen ohne Membran. Dies war nebenbei ein schöner Expressionsnachweis für den TSHR in den stabil transfizierten HEK-TSHR-Zellen ohne FLAG- und GFP-Tag, welche für viele Versuche verwendet wurden (vor allem Abschnitt 3.3 und 3.4, außerdem Abb. 4).

Im Sättigungsversuch mit  $^{125}\text{I}$ -bTSH an HEK-TSHR Membranen wurden steigende Konzentrationen Radioligand bis 45000 *counts per minute* (cpm) pro Ansatz verwendet (Abb. 12 B). Es konnte eine theoretische Maximalbindung ( $B_{\text{max}}$ ) von 4200 cpm/Ansatz und eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von 14200 cpm/Ansatz errechnet werden.



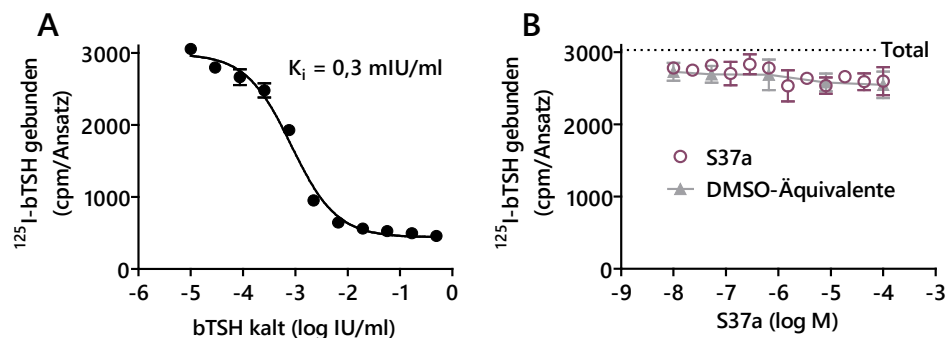
**Abb. 12. Etablierung eines Radioliganden-Bindungsassays mit  $^{125}\text{I}$ -bTSH.** **A:** HEK-Gesamtmembran bzw. Bindungspuffer (0  $\mu\text{g}$ ) oder HEK-TSHR-Membran in verschiedenen Proteinkonzentrationen wurden mit 6000 cpm (*counts per minute*)  $^{125}\text{I}$ -bTSH ohne (Total, Gesamtbindung) oder mit (NSB, unspezifische Bindung) 0,1 IU/ml nichtradioaktivem bTSH inkubiert. Die Gesamtbindung lag bei allen Proteinkonzentrationen bei HEK-TSHR-Membranen deutlich über der unspezifischen Bindung. Die unspezifische Bindung nahm bei höheren Membranmengen leicht zu.  $^{125}\text{I}$ -bTSH band nur geringfügig und nicht spezifisch an den Glasfaserfilter (0  $\mu\text{g}$ ) und Membran aus nicht transfizierten HEK-Zellen (HEK). **B:** Zur Ermittlung der spezifischen Bindung wurden 10  $\mu\text{g}$  HEK-TSHR-Membran je Ansatz mit steigenden Konzentrationen  $^{125}\text{I}$ -bTSH inkubiert und NSB von der Gesamtbindung subtrahiert.  $B_{\text{max}}$  entspricht der theoretisch möglichen maximalen spezifischen Bindung, also der Menge vorhandener Bindungsstellen. Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) ist die Konzentration an freiem Ligand bei halbmaximaler Bindung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten.

Anschließend wurden Verdrängungs-Versuche mit nichtradioaktiven (kalten) Liganden durchgeführt, um herauszufinden, ob S37a in der Lage ist, TSH am Rezeptor zu verdrängen (Abb. 13). Nichtradioaktives bTSH in steigender Konzentration sollte theoretisch eine konstante Konzentration  $^{125}\text{I}$ -bTSH verdrängen. Diese Positivkontrolle war erfolgreich (Abb. 13 A): Es konnte eine dreiparametrische (oberes Plateau,  $\text{IC}_{50}$ , unteres Plateau) Inhibitionskurve angepasst werden.

Anhand der ermittelten  $IC_{50}$  von 0,84 mIU/ml, sowie der  $K_d$  aus Abb. 12 B und der Konzentration des freien Radioliganden F

$$F = c[\text{hinzugefügt}] - c[\text{bei } IC_{50} \text{ gebunden}], \text{ also } F = 24874 \text{ cpm} - 1715 \text{ cpm} = 23159 \text{ cpm}$$

wurde mit der Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng, Prusoff, 1973; siehe Abschnitt 2.6.1) die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) für bTSH von 0,32 mIU/ml errechnet.



**Abb. 13. Verdrängungs-Assay mit S37a und  $^{125}\text{I}$ -bTSH.** HEK-TSHR-Membran wurde mit konstanter Menge radioaktivem Liganden (ca. 25000 cpm  $^{125}\text{I}$ -bTSH) und steigenden Konzentrationen nichtradioaktiven (kalten) Liganden inkubiert. **A:** Kaltes bTSH verdrängte  $^{125}\text{I}$ -bTSH. Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) wurde aus der  $IC_{50}$  errechnet und entspricht näherungsweise der  $K_d$ . **B:** S37a hemmt im Bereich von 10 nM bis 100  $\mu\text{M}$  nicht die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -bTSH. Die Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

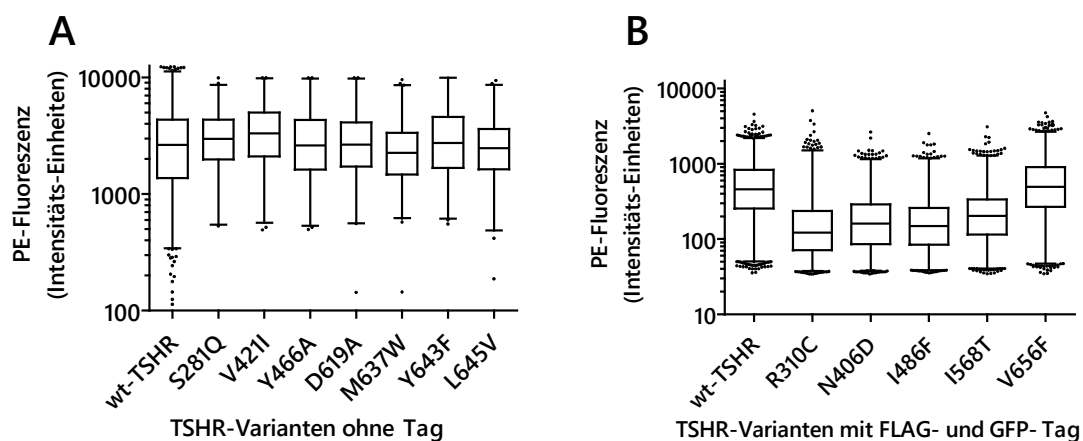
Für S37a bis 100  $\mu\text{M}$  wurde nur eine geringfügige Verringerung der Bindung von  $^{125}\text{I}$ -bTSH an HEK-TSHR-Membranen gemessen, die sich jedoch nicht von der Lösungsmittelkontrolle unterschied (Abb. 13 B). Damit kann man ausschließen, dass S37a unter den Bedingungen im Bindungsassay in der Lage ist, bTSH komplett vom TSHR zu verdrängen.



### 3.2.4 Konstitutiv aktive TSHR-Varianten werden von S37a abhängig von ihrer Position inhibiert oder aktiviert

Da S37a wahrscheinlich nicht in der bekannten allosterischen Bindungstasche in der Transmembrandomäne bindet (Abb. 9), wurde vermutet, dass S37a zwischen der Ektodomäne und der TMD, möglicherweise an den extrazellulären Schleifen (ECL) bindet. Um das zu überprüfen, wurde die Wirkung von S37a auf konstitutiv aktivierende Mutationen (CAM) des TSHR (Auswahl mittels <http://www.ssfa-gphr.de>) überprüft. Dafür wurden einerseits CAM in Bereichen der Ektodomäne (extrazelluläre Helix (EH), interner Agonist) ausgewählt sowie CAM, die in der TMD verteilt lagen.

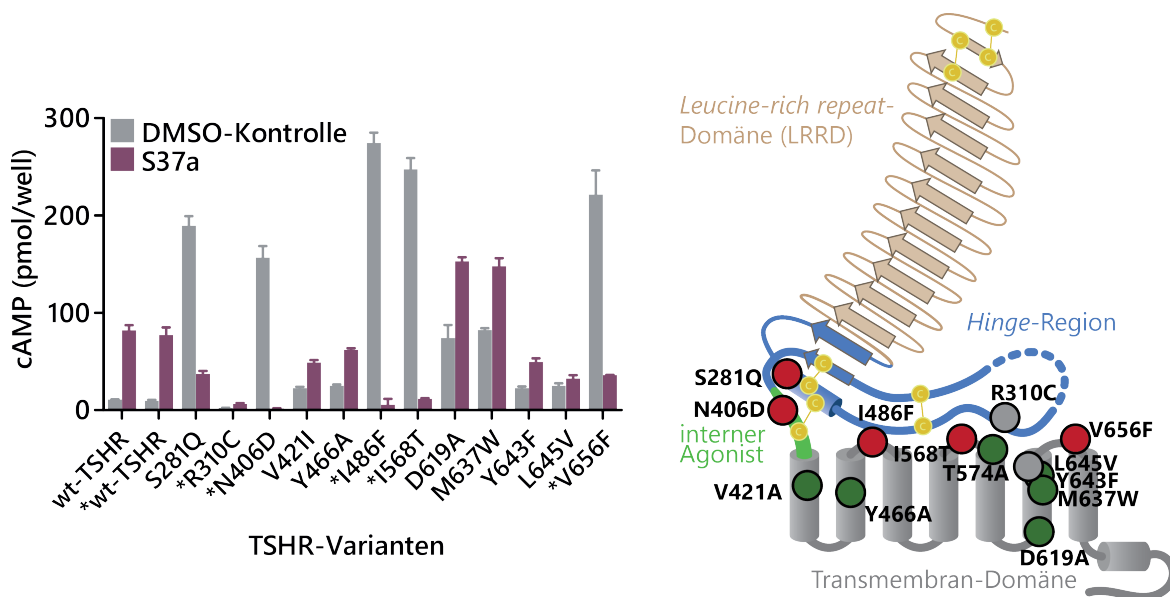
Die mittels Durchflusszytometrie gefundene Expression an der Zelloberfläche ist in der Abb. 14 dargestellt. Sie lag im Mittel (Median) bei den meisten Mutationen zwischen 85 und 125 % des wt-TSHR (Abb. 14 A und V656F in Tafel B); bei R310C, N406D, I486F und I568T war sie auf 45 bis 25 % reduziert.



**Abb. 14. Zelloberflächen-Expression von Varianten des TSHR mit konstitutiv aktivierenden Mutationen (CAM) in HEK-Zellen.** Durchflusszytometrische Messung der Zelloberflächenrezeptoren. Transient transfizierte HEK-Zellen wurden mit einem primären Maus-anti-TSHR-Antikörper (A) bzw. Maus-anti-FLAG-Antikörper (B) und einem sekundären R-PE-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Die Daten zeigen repräsentative Proben einer Doppelbestimmung mit je 10000 Zellen, die jeweils zwei- (A) bzw. dreimal (B) unabhängig durchgeführt wurde. Die Kästen zeigen den Interquartilsbereich mit Median an. 99 % der Werte liegen zwischen den Antennen.

Interessanterweise wurden ausschließlich solche CAM von S37a inhibiert, die in der EH (S281Q), im internen Agonisten (N406D) und in den ECL (I486F, I568T, V656F) liegen (Abb. 15, rot im TSHR-Schema). Im Gegensatz dazu wurden die CAM in der Transmembrandomäne und T574A im ECL2 nicht inhibiert. Stattdessen verhielt sich die Substanz dort wie im wt-TSHR, wo sie einen schwachen partialagonistischen Effekt aufweist (Abb. 15, dunkelgrün) oder sie hatte kaum Einfluss (grau).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass S37a nahe der Kontaktfläche von Ekto- und Transmembrandomäne in den Aktivierungsmechanismus des TSHR eingreift.

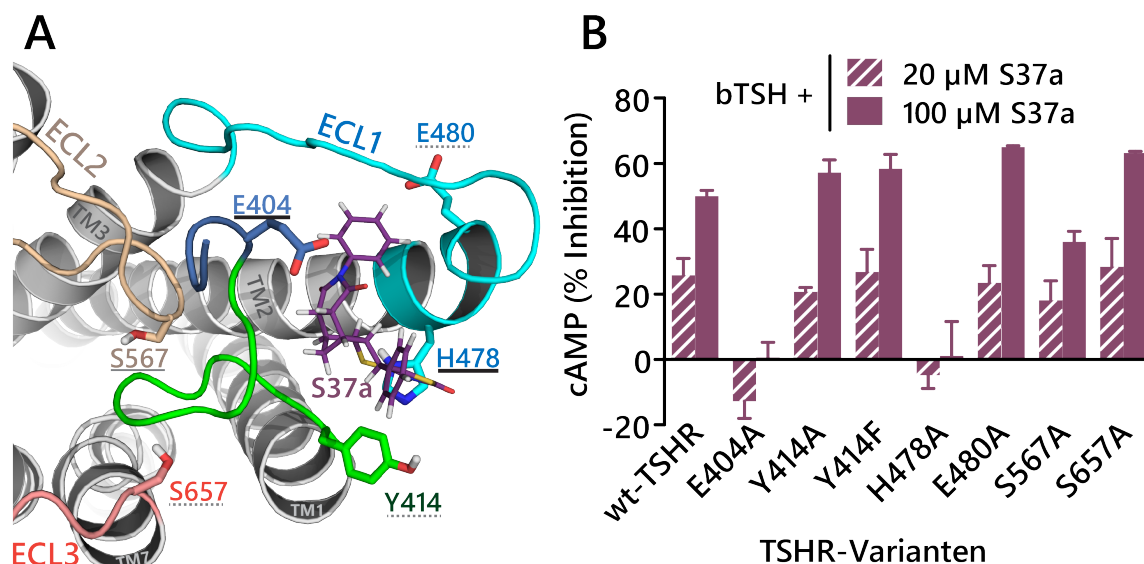


**Abb. 15. Effekt von S37a auf die konstitutive Aktivität von TSHR-Varianten (CAM) und deren Lage im Rezeptor.** Transient transfizierte HEK-Zellen wurden mit 100  $\mu$ M S37a, jedoch nicht mit TSH behandelt. Im wt-TSHR und vielen CAM in der Transmembran-Domäne ist S37a allein ein schwacher Agonist (dunkelgrüne Kreise im TSHR-Schema rechts) oder hat kaum einen Effekt auf die cAMP-Bildung (graue Kreise). Im Gegensatz dazu wird die konstitutive Aktivität von fünf CAM in den extrazellulären Loops bzw. im internen Agonisten (N406D) und in der konvergierenden Helix der Hinge-Region (S281Q) stark von S37a inhibiert (rote Kreise). Die Daten sind angegeben als Mittelwert und Standardabweichung von Duplikaten. \* FLAG-Rezeptor-GFP (Vgl. Abb. 14 B).

### 3.2.5 Die TSHR-Mutationen E404A und H478A werden nicht von S37a inhibiert

Die Kristallstruktur von S37a (Abb. 5 D) wurde in das molekulare Modell des inaktiven TSHR, welches in der Arbeitsgruppe generiert wurde, gedockt. In der günstigsten Position füllte S37a eine Bindungstasche, die begrenzt war vom ECL1, vom internen Agonisten und der EH. Es wurden Aminosäurepositionen im extrazellulären Bereich der TMD an der Schnittstelle zur Ekto-domäne ausgewählt, welche für den Kontakt mit S37a infrage kamen (Abb. 16 A). Diese wurden zu Alanin bzw. Y414 auch zu Phenylalanin mutiert. Die Mutationen selbst sollten keinen starken Effekt auf die  $G_{\alpha_s}$ -Signaltransduktion haben, um die Ergebnisse der cAMP-Messungen des folgenden Versuchs möglichst ausschließlich auf den Einfluss der Substanz S37a zurückführen zu können. Dies wurde im Vorfeld, soweit möglich, mithilfe der Online-Datenbank bekannter TSHR-Mutationsergebnisse ([www.ssfa-gphr.de](http://www.ssfa-gphr.de), Kreuchwig *et al.*, 2013) geklärt. Die Klonierung, der Expressionsnachweis sowie Vorversuche zur Bestimmung der  $EC_{50}$  von bTSH fanden im Rahmen einer Masterarbeit statt und sind dort ausführlich beschrieben (Mendieta, 2019). Zusammengefasst, waren die Mutationen in HEK-Zellen ähnlich stark wie der wt-TSHR exprimiert und an der Plasmamembran lokalisiert. Sie wurden durch bTSH aktiviert – E404A, Y414A, S567A und S657A mit leicht erhöhter  $EC_{50}$ .

Die TSHR-Varianten wurden mit etwa der jeweiligen  $EC_{80}$  von bTSH behandelt (2 mIU/ml bzw. 20 mIU/ml bei Varianten mit erhöhter  $EC_{50/80}$ ) und im Vergleich dazu zusätzlich mit S37a, um den antagonistischen Effekt darzustellen (% Inhibition, Abb. 16B). Es ist auffällig, dass die Varianten E404A und H478A nicht durch S37a inhibiert wurden, während Y414A und -F, E480A sowie S657A ähnlich stark, wie der wt-TSHR inhibiert wurden; bei S567A war die antagonistische Wirkung von S37a etwas abgeschwächt.



**Abb. 16. Antagonistischer Effekt von S37a auf TSHR-Mutationen in extrazellulären Bereichen der Transmembranen.** **A:** Inhibition der TSHR-induzierten cAMP-Akkumulation durch 20 und 100  $\mu$ M S37a in Prozent im Vergleich zum durch bTSH aktivierten Rezeptor (=0%; behandelt mit etwa der jeweiligen  $EC_{80}$  von bTSH). S567A wird etwas schwächer, als der wt-TSHR, E404A und H478A gar nicht durch S37a inhibiert. HEK-Zellen wurden transient mit den TSHR-Varianten (mit FLAG- und GFP-Tag) transfiziert und zwei Tage später mit bTSH und S37a in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardfehler von zwei unabhängigen Versuchen. **B:** Das TSHR-Modell zeigt die Positionen der mutierten Aminosäuren (grün: interner Agonist F405-Y414). Die Docking-Position von S37a (violett) mit Kontakt zu E404 und H478 wird durch den fehlenden Antagonismus nach Substitution mit Alanin unterstützt. Zudem sind diese Positionen TSHR-spezifisch und S37a wirkt selektiv auf den TSHR (Abschnitt 3.4.2).

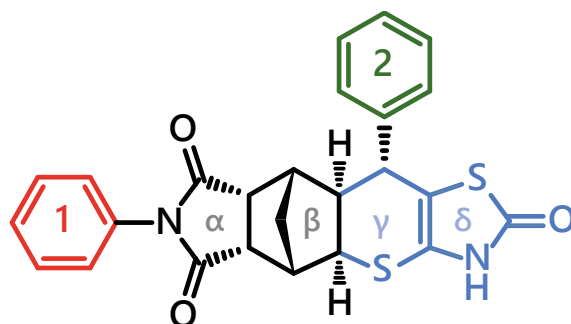
Dieses Ergebnis deutet auf einen Verlust der Interaktion von S37a an den Positionen E404 und H478, wenn diese zu Alanin mutiert werden, was mit der Docking-Position der Substanz in Abb. 16 A einhergeht. Da diese Aminosäuren auch TSHR-spezifisch sind, könnten sie für die Selektivität der Substanz verantwortlich sein.

### 3.3 Struktur-Funktions-Analysen von S37-Analoga

Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*structure-activity relationships*, SAR) von S37-Derivaten und -Analoga wurden untersucht, um die Wirkungsweise der Substanz am TSHR besser zu verstehen, um Ansatzpunkte für eine gezielte Optimierung der chemischen Struktur zu finden und um ggf. höher affine Verbindungen aufzudecken.

Zunächst wurden von E. Specker der AG Medizinische Chemie am FMP gezielt einzelne Substitutionen durch funktionelle Gruppen an den Phenylringen von S37 vorgenommen (Abb. 17 rot und grün, Abschnitt 3.3.1). Später wurde von M. Lisurek in der AG R. Kühne (FMP) eine

Datenbanksuche nach kommerziell erhältlichen S37-ähnlichen Substanzen ausgeführt. Von den 176 gefundenen wurden zwölf Verbindungen bestellt und getestet, die ebenfalls vorrangig an den Phenylringen verändert waren (Abschnitt 3.3.2). Außerdem wurden Synthesen bei der Firma ChemDiv (San Diego, USA) in Auftrag gegeben, mit dem Ziel S37-Analoga herzustellen, welche Veränderungen am Indol-Heterozyklus, aufweisen (Abschnitt 3.3.3).

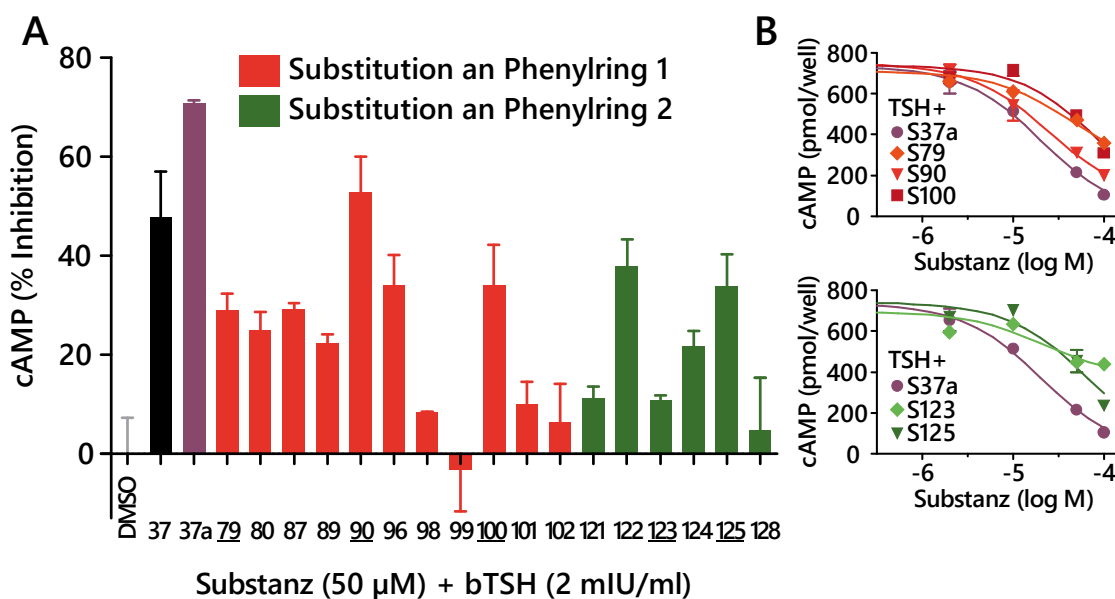


**Abb. 17. Strukturbestandteile von S37a, die für Struktur-Funktions-Analysen verändert wurden.** Die Phenylringe wurden mit 1 (rot) und 2 (grün) bezeichnet. Der Indol-Heterozyklus ( $\gamma$ - und  $\delta$ -Ring) ist blau dargestellt. Diese Farben finden sich in den Graphen wieder. Der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ring (Pyrrolidindion bzw. Norbornen, schwarz) blieben in der Regel unverändert.

Die Substanzen wurden auf ihre Wirkung auf die TSHR-induzierte  $G\alpha_s$ -Signaltransduktion in stabil transfizierten HEK-TSHR-Zellen untersucht. Dabei wurden jeweils die Inhibition der TSH-induzierten cAMP-Akkumulation (Antagonismus) und die Wirkung der Substanzen ohne Hormon (Agonismus) bei 50  $\mu$ M gemessen.

### 3.3.1 S37-Derivate mit einzelnen Substitutionen an den Phenylringen

Die antagonistische Wirkung der S37-Derivate im Vergleich zu S37 und S37a sind in Abb. 18 dargestellt. Derivate mit Substituenten am Phenyl 1 sind rot dargestellt, am Phenyl 2 grün. Es handelte sich um Racemate. Nur S90 (*p*-Methylgruppe an Phenyl 1) inhibierte die cAMP-Bildung mit etwa 50 % etwas stärker, als S37, aber nicht stärker, als das aktive Enantiomer S37a. Die meisten Derivate zeigten 30 bis 40 % Inhibition und es ließen sich keine deutlichen Beziehungen dazu ableiten, an welchem Phenylring substituiert wurde.

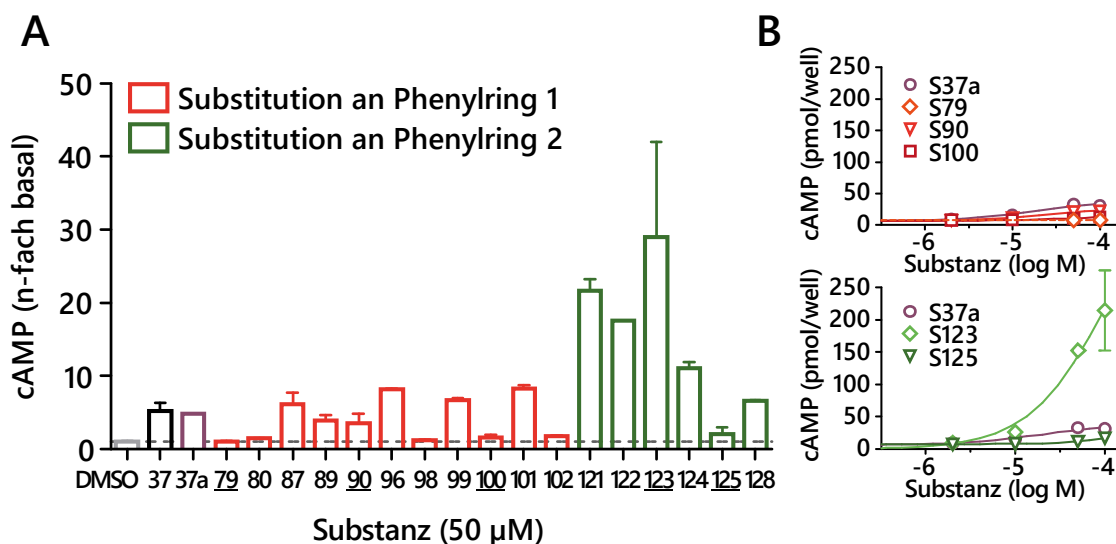


**Abb. 18. Antagonismus von S37-Derivaten (Synthese am FMP) mit Substituenten an den Phenylringen.** **A:** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit 2 mIU/ml bTSH und gleichzeitig mit 50 µM S37-Derivaten behandelt. Der antagonistische Effekt auf die cAMP-Bildung ist in Prozent Inhibition im Vergleich zur Stimulation nur mit bTSH angegeben. **B:** Mit ausgewählten S37-Derivaten (unterstrichen in A) wurden Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt (nach Stimulation mit 2 mIU/ml bTSH). S123 (Agonist in Abb. 19) war ein schwacher TSHR-Antagonist. S90 wirkte ähnlich stark, wie S37 (A), aber keine der Verbindungen hat eine niedrigere  $IC_{50}$ , als S37a (B). Tendenzen bezüglich der beiden Phenylringe waren nicht so klar, wie beim agonistischen Effekt in Abb. 19. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

Die Inhibitionswerte bei 50 µM korrelieren mit den Affinitäten (Abb. 18 B), da bei dieser Konzentration in den meisten Fällen die dynamischen Bereiche der Konzentrations-Wirkungs-Kurven liegen. Eine Ausnahme war S123, deren  $IC_{50}$  zwar ähnlich war, nicht jedoch der Maximaleffekt.

Dies lässt sich mit der agonistischen Wirkung erklären, die in Abb. 19 dargestellt ist. S123 war nämlich von allen S37-Derivaten der der stärkste TSHR-Agonist. Die Substanz enthält eine Methoxygruppe in *para*-Stellung am Phenyl 2. Alle *para*-Substitutionen am Phenyl 2 verstärkten den Agonismus auf das 8- bis 30-Fache der TSHR-Basalaktivität (Vgl. S37 ca. 6-fach). Nur S125 mit einer *meta*-Hydroxygruppe war kein Agonist.

Die Substanzen mit Substitutionen am Phenyl 1 waren nur schwache Agonisten, ähnlich wie S37a. Bei S79, 80 und 100 fehlte der Agonismus. Diese waren mit Amino-, Carbonyl- bzw. Hydroxygruppe in *para*-Stellung substituiert. Methylester und -ether in *para*- (S87 bzw. 89) und *meta*-Stellung (S96) erhielten den agonistischen Effekt. Eine Methoxygruppe am Phenyl 1 in *ortho*-Position (S99) sowie ein zusätzlicher Phenylring (S98) bewirkten den Verlust sowohl der agonistischen, als auch der antagonistischen Wirkung auf den TSHR.



**Abb. 19. Agonismus von S37-Derivaten mit einzelnen Substituenten an den Phenylringen (Synthese am FMP).**

**A:** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit S37-Derivaten ohne TSH-Stimulation behandelt, um deren agonistische Wirkung auf die cAMP-Bildung zu messen. Substitutionen am Phenylring 1 (s. Abb. 17) sind rot dargestellt, am Phenylring 2 grün. Letztere zeigten häufiger einen stärkeren Agonismus über der zehnfachen Basalaktivität des TSHR (DMSO bzw. gestrichelte Linie). **B:** Mit ausgewählten S37-Derivaten (unterstrichen in A) wurden Konzentrations-Wirkungskurven in ermittelt. Diese bestätigten den starken agonistischen Effekt von S123 und gaben Hinweise auf die Affinität: Die  $EC_{50}$  lag bei allen Verbindungen über  $10\ \mu\text{M}$  im Bereich von S37a. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

Die Strukturen einiger Substanzen sind exemplarisch in Tabelle 8 (Seite 72) dargestellt und anhand der Inhibitionswerte sortiert. Eine Liste aller getesteten Substanzen, nach Nummern sortiert, befindet sich im Anhang.

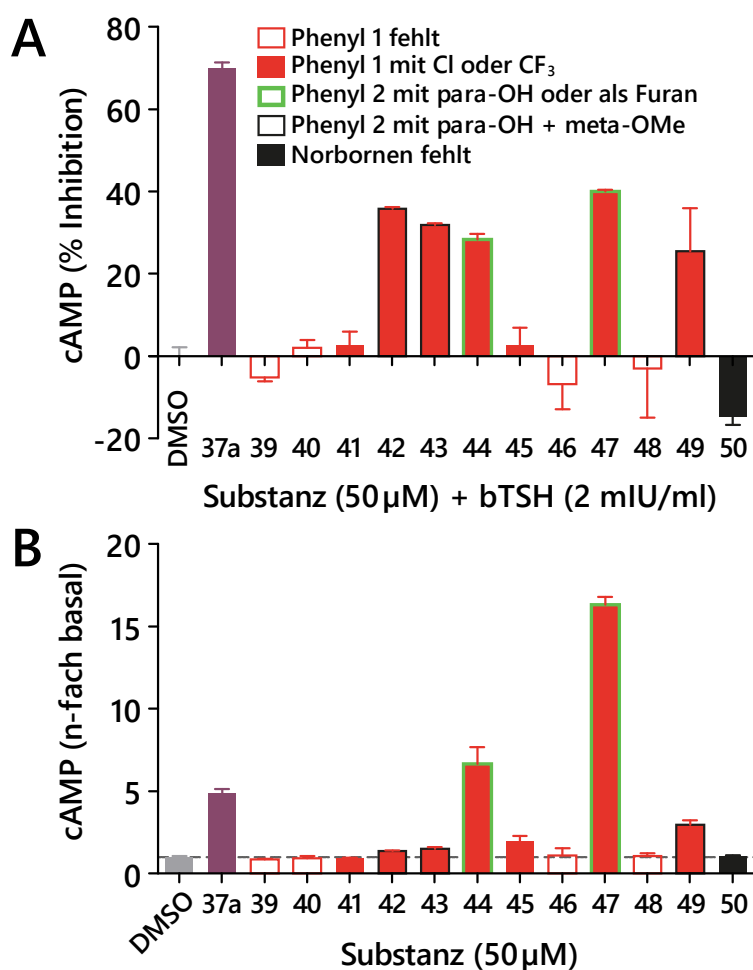
### 3.3.2 Katalog-SAR – Weitere S37-Analoga mit Modifikationen an den Phenylringen

In einer Datenbanksuche kommerziell erhältlicher Substanzen (*SAR by catalogue*) wurden weitere S37-Analoga identifiziert, von denen zwölf für Untersuchungen am TSHR ausgewählt wurden, die Modifikationen an beiden Phenylringen besaßen. Keine der Substanzen war ein stärkerer TSHR-Antagonist (Abb. 20 A), S44, S47 zeigten hingegen deutlichen Agonismus (Abb. 20 B).

Es ließen sich einige Struktur-Funktions-Beziehungen ableiten:

1. Die Verbindungen mit selektivem Antagonismus (ohne agonistische Wirkung) S42, 43 und 49 sind am Phenyl 2 sowohl in der *para*- als auch in der *meta*-Position mit Hydroxy- bzw. Methoxygruppen substituiert.
2. Die beiden relativ starken Agonisten weisen Veränderungen am Phenyl 2 auf: S47 besitzt eine Hydroxylgruppe in *para*-Stellung und bei S44 ist dieser Phenylrest durch einen Furanring ersetzt.
3. S45 (*p*-Brom am Phenyl 2) und S41 (Ring 2 ist ein Pyridin) hatten weder aktivierende, noch inhibierende Wirkung am TSHR.
4. Alle Substanzen ohne Phenyl 1 (S39, 40, 46, 48) oder Norbornenring (S50) hatten keine Wirkung am TSHR.

5. Das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein einer Wirkung auf den TSHR war nicht davon abhängig, ob am Phenyl 1 Chlor oder Trifluormethyl vorlag bzw. ob am Thiazolring ( $\delta$ -Ring, Abb. 17) eine Keto- oder Hydroxygruppe vorhanden war.



**Abb. 20. Die Wirkung von S37-Analoga mit mehreren Substituenten an den Phenylringen auf den TSHR (Katalog-SAR).** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit S37-Analoga mit (A, antagonistische Wirkung) und ohne (B, agonistische Wirkung) bTSH-Stimulation (2 mIU/ml) behandelt und die intrazelluläre cAMP-Bildung mittels RIA gemessen. Alle Analoga mit vorhandenem Phenyl 1 wiesen dort Chlor in *para*- oder Trifluormethyl in *meta*-Stellung auf (rot gefüllte Säulen). Bestimmte Substitutionen an Phenyl 2 sind durch Umrahmung der Säulen gekennzeichnet und zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf die agonistische Wirkung (B). Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

Die Strukturen einiger Substanzen sind exemplarisch in Tabelle 8 zusammen mit Strukturen aus Abschnitt 3.3.1 dargestellt und anhand der Inhibitionswerte sortiert. Eine Liste aller getesteten Substanzen, nach Nummern sortiert, befindet sich im Anhang.

**Tabelle 8. Ausgewählte S37-Analoga aus Abb. 18 bis 20, sortiert nach Inhibition der cAMP-Akkumulation.** Zu jeder Substanz sind die antagonistische Wirkung (% Inhibition bei 50  $\mu$ M Substanz in Anwesenheit von 2 mIU/ml bTSH) und die agonistische Wirkung (als n-Faches der Basalaktivität bei 50  $\mu$ M Substanz ohne TSH) angegeben. Für S37a ist die Strukturformel des aktiven Enantiomers dargestellt. Bei Substanzen, wo die Stereochemie nicht klar definiert war, sind die Keilstriche nicht eingezeichnet. Racemate sind mit „rac“ gekennzeichnet, jedoch nur das zu S37a analoge Enantiomer dargestellt.

Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal	Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal
37a		71	4,9	79 rac		29	-0,01
90 rac		53	2,5	123 rac		11	28,0
47		40	15,3	101 rac		10	7,2
42		36	0,4	45		2,5	0,9
100 rac		34	0,6	99 rac		-3,1	5,6
125 rac		34	1,0	46		-6,8	0,1



### 3.3.3 Veränderungen am heterozyklischen Grundgerüst von S37a

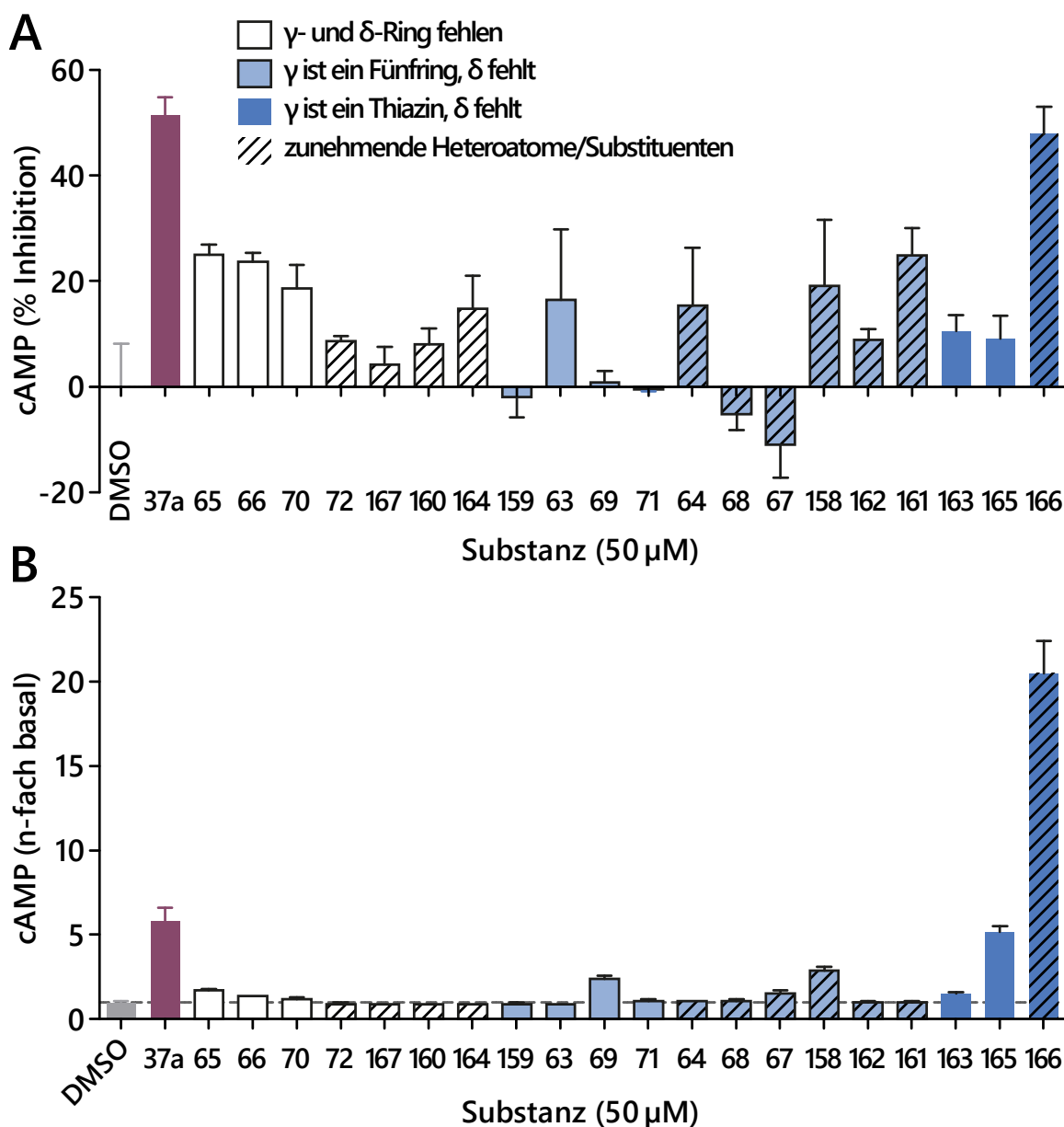
Für weitere SAR-Untersuchungen wurden zweimal je zehn Substanzen (S63-72 bzw. S158-167) synthetisiert, bei denen der Indol-Heterozyklus ( $\delta$ - und  $\gamma$ -Ring in Abb. 17) von S37a modifiziert wurde. Diese Verbindungen wurden zusammen auf ihre Wirkung auf die TSHR-induzierte cAMP-Signaltransduktion untersucht und aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit neu gruppiert (Abb. 21). Innerhalb der Gruppen wurden die Substanzen nach der Anzahl der Heteroatome bzw. großer Substituenten sortiert (gestreifte Säulen).

In der ersten Gruppe (weiße Säulen) enthielt das zentrale Ringsystem nur Pyrrolidindion und Norbornen ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ring). Ein Phenylring war über eine Brücke an das Norbornen gebunden. Den stärksten hemmenden Effekt auf die cAMP-Bildung in HEK-TSHR-Zellen zeigten S65, 66 und 70, bei denen diese Brücke keine Heteroatome enthielt (Abb. 21 A).

In der zweiten Gruppe (hellblaue Säulen) enthielten die Substanzen zusätzlich einen Fünfring (Thiophen, Isoxazol, Pyrazol, oder Triazol) an der Stelle des  $\delta$ -Rings (Sechsring, Thiopyran) von S37a. Diese Verbindungen zeigten keine oder bis zu 20 % Inhibition der cAMP-Bildung. S158, 162 und 161 enthielten, wie auch S164 aus der ersten Gruppe, eine Carbonylgruppe zwei Atome vom Norbornen entfernt und zeigten alle eine deutliche antagonistische Wirkung auf den TSHR.

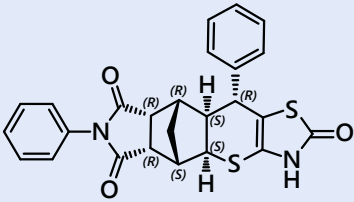
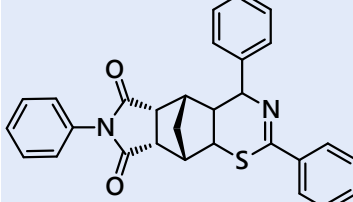
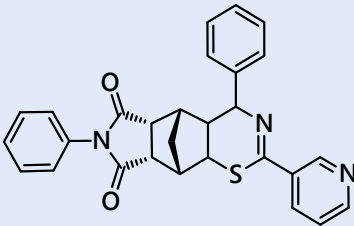
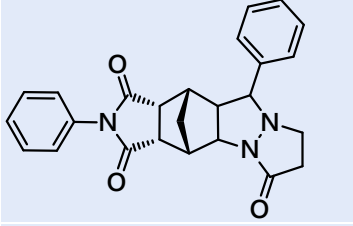
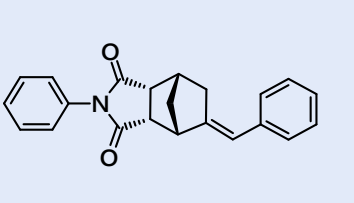
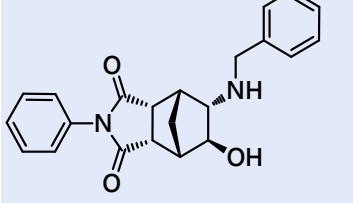
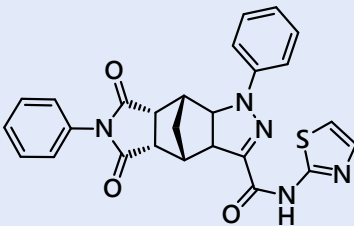
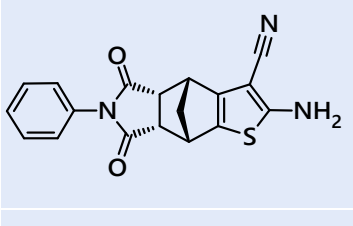
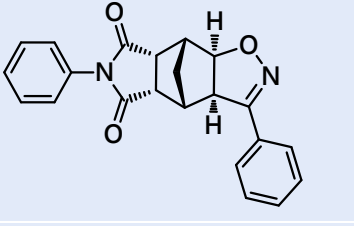
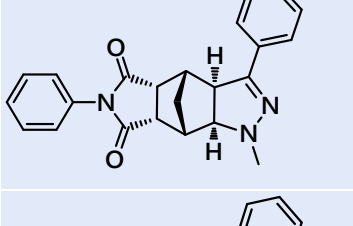
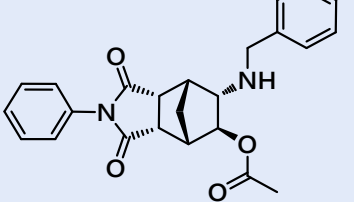
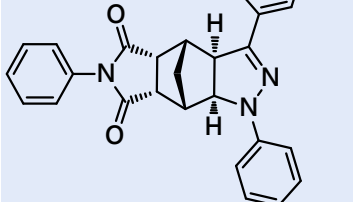
Die Substanzen S163, 165 und 166 (dunkelblaue Säulen) enthielten einen Thiazinring statt des Thiopyranrings von S37a, jedoch ebenfalls nicht den vierten  $\gamma$ -Ring. Sie enthielten einen Phenylring analog zur Position des Phenylrings 2 von S37a. S165 und 166 besaßen zusätzlich dazu in *meta*-Position einen zweiten aromatischen Ring. Dies war bei S165 ein Phenylring und bewirkte dort nur einen Anstieg der agonistischen Aktivität (Abb. 21 B). Bei S166 war es ein Pyridin. Diese Substanz zeigte mit 48 % Inhibition die stärkste antagonistische Wirkung auf den TSHR, ähnlich stark, wie S37a bzw. S90 aus Abschnitt 3.3.1., allerdings auch eine deutlich höhere agonistische Wirkung, als diese (ca. 20-fache Basalaktivität).

Die Strukturen einiger Substanzen sind exemplarisch in Tabelle 9 dargestellt und anhand der Inhibitionswerte sortiert. Eine Liste aller getesteten Substanzen, nach Nummern sortiert, befindet sich im Anhang (Tabelle 10).



**Abb. 21. Wirkung S37a-ähnlicher Substanzen mit modifiziertem heterozyklischem Grundgerüst auf den TSHR.** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit S37a-ähnlichen Substanzen mit (A, antagonistische Wirkung) und ohne (B, agonistische Wirkung) bTSH-Stimulation (2 mIU/ml) behandelt und die intrazelluläre cAMP-Bildung mittels RIA gemessen. Die Substanzen aus zwei verschiedenen Synthese-Durchgängen wurden zusammen ausgewertet und anhand des Grades ihrer Veränderung im Vergleich zu S37 gruppiert. Die Modifikationen befanden sich am  $\delta$ - und  $\gamma$ -Ring von S37a (Vgl. Abb. 17). Diese waren entweder durch azyklische Bestandteile ersetzt (weiße Säulen) oder der Thiopyranring von S37a ( $\delta$ -Ring) war durch einen Fünfring (hellblau) oder einen Thiazinring (dunkelblau) ersetzt. Eine größere Anzahl an Heteroatomen oder Substituenten an diesen Ringmodifikationen ist durch Streifen gekennzeichnet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

**Tabelle 9. Ausgewählte S37a-Analoga aus Abb. 21, sortiert nach Inhibition der cAMP-Akkumulation.** Zu jeder Substanz sind die antagonistische Wirkung (% Inhibition bei 50  $\mu$ M Substanz in Anwesenheit von 2 mIU/ml bTSH) und die agonistische Wirkung (als n-Faches der Basalaktivität bei 50  $\mu$ M Substanz ohne TSH) angegeben.

Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal	Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal
37a		52	4,8	165		9	4,6
166		48	21,0	162		9	0,07
65		25	0,6	160		8	0,0
161		25	0,09	159		-2	0,02
63		16	-0,1	68		-5,2	0,06
164		15	-0,1	67		-11	0,5

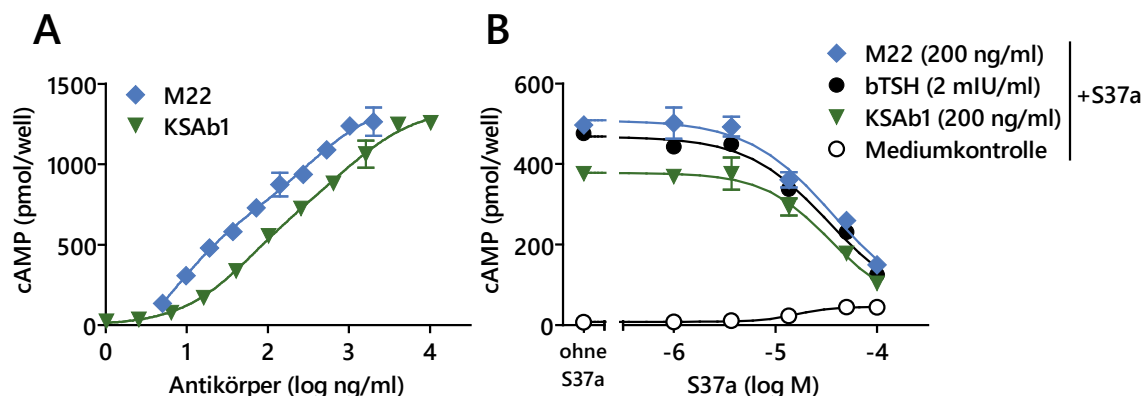
### 3.4 Therapeutisches Potenzial von S37a

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche hatten das Ziel, Endpunkte zu untersuchen, die für die Therapie der endokrinen Orbitopathie (EO) relevant sein könnten. Im Abschnitt 3.2 sowie in vorangegangenen Arbeiten in der Gruppe (Hoyer, 2014) wurde die Ligand-Rezeptor-Interaktion des Antagonisten S37(a) und des TSHR im Zusammenhang mit den Agonisten bTSH und C2 untersucht.

#### 3.4.1 Inhibition von Thyreoidea-stimulierenden Antikörpern (TSAb) durch S37a

Neben TSH war es entscheidend, zu überprüfen, ob S37a in der Lage ist, auch TSHR-stimulierende Antikörper (TSAb) zu inhibieren, die entscheidend bei der Pathogenese der EO sind. Zuerst wurden monoklonale Antikörper verwendet, welche die cAMP-Akkumulation in HEK-TSHR stimulieren (Abb. 22 A). Der humane Antikörper M22 stammt ursprünglich von einem Morbus-Basedow-Patienten (Sanders *et al.*, 2003) und der murine KSAb1 wurde durch Immunisierung von BALB/c-Mäusen generiert (Gilbert *et al.*, 2006). Abb. 22 A zeigt, dass beide Antikörper über einen weiten Konzentrationsbereich von 1 bis 10000 ng/ml die cAMP-Bildung aktivieren. Für beide Antikörper konnten zweiphasige Aktivierungskurven angepasst werden, was das Vorhandensein von funktionsrelevanten Bindungsstellen an den jeweils zwei Fab-Abschnitten illustriert.

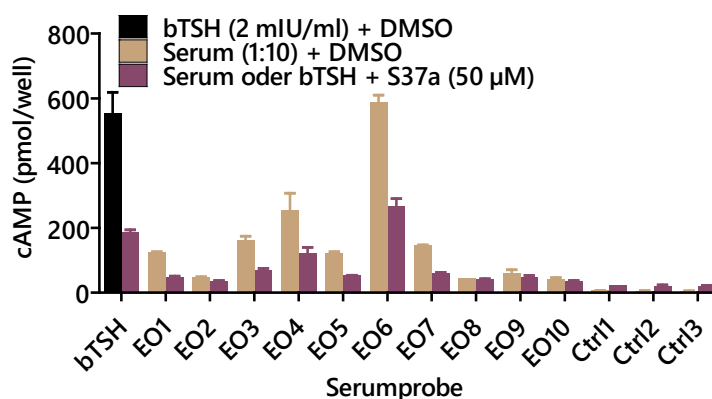
Die durch die monoklonalen Antikörper ausgelöste cAMP-Bildung wurde von S37a konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 22 B). Dabei verliefen die Inhibitionskurven sehr ähnlich zur Kontrolle mit bTSH.



**Abb. 22. S37a inhibiert monoklonale humane und murine Thyreoidea-stimulierende Antikörper (TSAb).** Stabil mit hTSHR transfigurierte HEK-Zellen (HEK-TSHR) wurden (A) mit dem humanen TSAb M22 oder dem murinen monoklonalen Antikörper KSAb1 aktiviert bzw. (B) bei konstanter Konzentration von M22, KSAb1 oder bTSH mit steigenden Konzentrationen S37a bis 100  $\mu$ M inhibiert. Die  $IC_{50}$  von S37a lag bei allen drei Agonisten sehr nahe beieinander. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

Im zweiten Schritt wurden Seren von EO-Patienten in *ex-vivo*-Experimenten untersucht. Da bei verschiedenen EO-Patienten vermutlich unterschiedliche Antikörper vorkommen und auch bei einem einzelnen Patienten oft oligoklonale Antikörper vorliegen (McLachlan, Rapoport, 1996), war es wichtig, herauszufinden, ob S37a auch die TSHR-induzierte cAMP-Bildung hemmen kann, die durch das Serum von Patienten ausgelöst wird, die tatsächlich an EO erkrankt waren.

In Abb. 23 ist ein *ex-vivo*-Versuch dargestellt, in dem HEK-TSHR-Zellen mit EO-Seren von Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung behandelt wurden und anschließend die intrazelluläre cAMP-Akkumulation gemessen wurde. Die Serumproben wurden dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Anja Eckstein (Universitätsklinikum Essen) mit den jeweiligen TRAK-Werten bereitgestellt. Die TRAK-Werte (TSHR-Autoantikörper) wurden dort mit dem Elecys Anti-TSHR-Assay (Roche) ermittelt, der die Bindung von TSHR-Antikörpern misst und nicht zwischen aktivierenden und inaktivierenden Antikörpern unterscheidet. Dennoch gab es zwischen den TRAK-Werten und den hier ermittelten cAMP-Werten grobe Übereinstimmung. Der klinische Status der Patienten war in der Regel als schwer eingestuft, die Patienten mit den Seren EO5, 9 und 10 als mild und bei EO8 als moderat. Auch diese Einstufung findet sich tendenziell in der Aktivierung der cAMP-Bildung wieder (Abb. 23, braune Säulen). Das Serum mit dem höchsten TRAK-Wert (EO6) zeigte auch die stärkste cAMP-Aktivierung, die in 10-facher Verdünnung ähnlich hoch war, wie die von 2 mIU/ml bTSH ( $EC_{80}$ ).



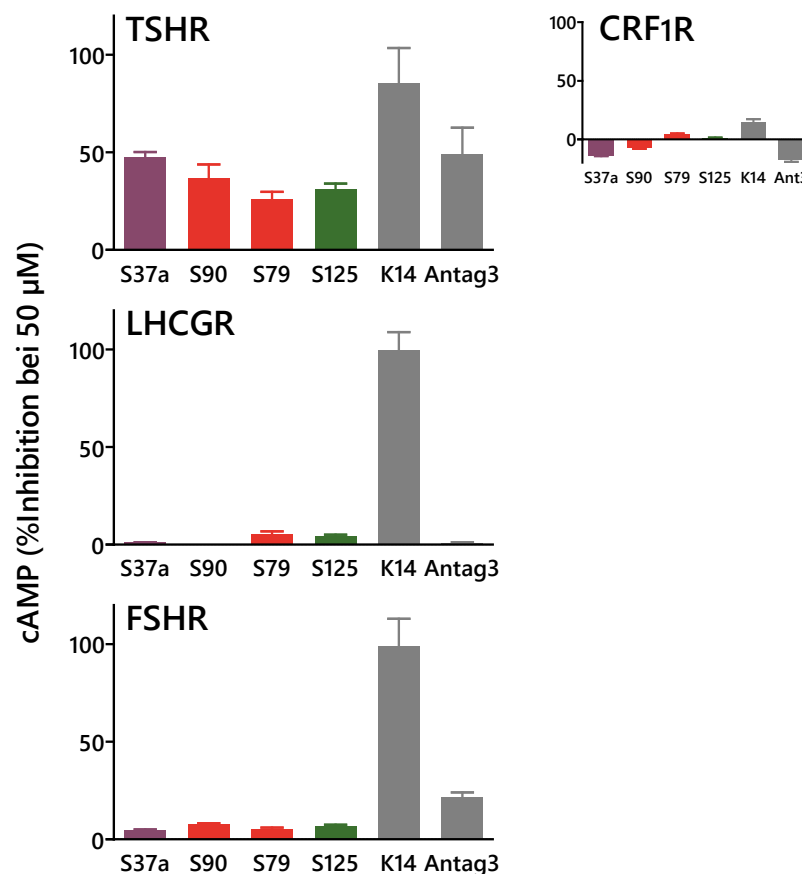
**Abb. 23. S37a hemmt die TSHR-Aktivierung durch Patientenserum *ex vivo*.** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit TSHR-aktivierenden Seren von Patienten mit endokriner Orbitopathie (EO) in 10-facher Verdünnung behandelt. Als Positivkontrolle diente bTSH, als Negativkontrolle (Ctrl) wurde Serum von nicht Erkrankten verwendet. Durch die Zugabe von S37a wurde die cAMP-Bildung bei stark aktivierenden Seren, wie bei bTSH, um 50 bis 60 % gesenkt. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen dargestellt.

Vor allem die stark TSHR-aktivierenden Serumproben mit  $\geq 100$  pmol/Well cAMP, welche alle von Patienten mit schwerer EO stammten, wurden wie bTSH zu 50 bis 60 % von 50  $\mu$ M S37a inhibiert (lila Säulen). Schwächer aktivierende Seren wurden kaum oder schwach von S37a inhibiert, was wahrscheinlich an dem schwachen agonistischen Effekt von S37a liegt, den man bei den nicht TSHR-aktivierenden Kontrollseren (Ctrl) erkennen kann.

### 3.4.2 TSHR-Selektivität von S37-Derivaten

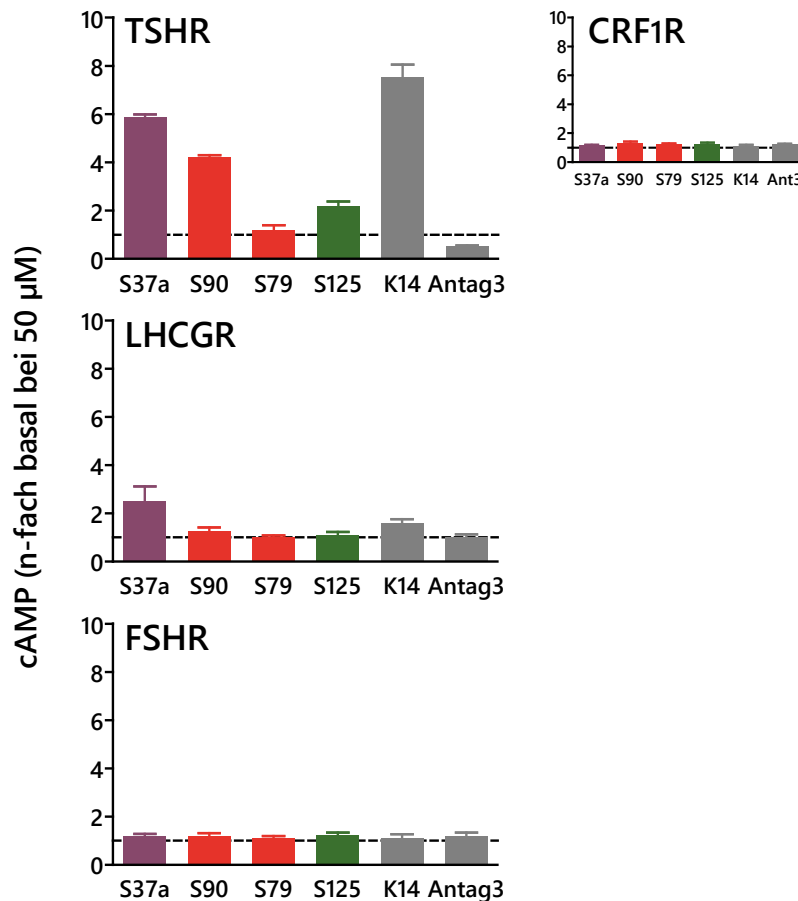
Wegen der hohen Sequenzhomologie der GPHR war es von besonderem Interesse, selektive TSHR-Antagonisten zu identifizieren, welche die Gonadotropin-Rezeptoren FSHR und LHCGR nicht beeinflussen. Die TSHR-Selektivität wurde zuvor bereits für S37-rac. nachgewiesen (Hoyer, 2014) und wurde hier zusätzlich für ausgewählte S37-Derivate sowie für die enantiomerenreine Substanz S37a untersucht.

Zuerst wurde die Selektivität des antagonistischen Effekts auf die cAMP-Akkumulation in HEK-Zellen untersucht (Abb. 24). Dafür wurden der TSHR, die Gonadotropin-Rezeptoren FSHR und LHCGR sowie als Kontrolle der nicht nahe verwandte Klasse B  $G_s$ -gekoppelte Rezeptor für *corticotropin releasing factor* Typ 1 (CRF1R) verwendet. Sie wurden mit dem jeweiligen Hormon aktiviert und mit den S37-Derivaten S90, S79 und S125 bzw. mit S37a behandelt. Diese Substanzen wiesen keinen antagonistischen Effekt am FSHR oder LHCGR auf. Die Liganden anderer Arbeitsgruppen waren nicht so hoch TSHR-spezifisch: K14 (Latif *et al.*, 2016) war ein starker Antagonist in allen GPCR, Antag3 zeigte TSHR-Präferenz, inhibierte aber zusätzlich leicht den FSHR. Die CRF<sub>1</sub>R-Aktivierung wurde von den Substanzen nicht deutlich beeinflusst.



**Abb. 24. Antagonismus: S37-Derivate hemmen die Hormon-induzierte cAMP-Bildung nur am TSHR.** Die homologen Rezeptoren für TSH, Folitropin (FSH) und Lutropin bzw. Choriongonadotropin (LH, CG) sowie als Kontrolle der Klasse-B-GPCR *corticotropin-releasing-factor*-Rezeptor 1 (CRF<sub>1</sub>R) lagen in stabil transfizierten HEK-Zellen vor. Sie wurden mit dem jeweiligen Hormon aktiviert (2 mIU/ml bTSH; 20 ng/ml rekombinantes humanes (rh)FSH; 0,5 IU/ml humanes (h)CG; CRF<sub>1</sub>R mit 2 nM Sauvagine) und mit 50 µM der angegebenen Substanzen inhibiert. Die Reduktion des gebildeten cAMP durch die Antagonistenbehandlung ist angegeben als Prozent Inhibition. 100 % Inhibition entspricht der Reduktion bis zum basalen cAMP-Level. S37a und die Derivate mit Substituenten am Phenylring 1 (rot) und 2 (grün) sind TSHR-selektiv. Die Antagonisten aus anderen Arbeitsgruppen sind grau dargestellt. K14 (Latif *et al.*, 2016) inhibierte alle Glykoproteinhormon-Rezeptoren (GPCR) stark. Antag3 (Neumann *et al.*, 2014) wies eine TSHR-Präferenz auf, inhibierte aber FSHR leicht. CRF<sub>1</sub>R wird von den Substanzen nicht deutlich inhibiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

Da S37a und einige Derivate auch partielle TSHR-Agonisten sind, war es möglich, deren Wirkung auf die Rezeptoren ohne Hormone zu untersuchen (Abb. 25). Interessanterweise aktivierte mit Ausnahme von S37a keine der untersuchten Substanzen einen anderen Rezeptor, als den TSHR. S37a aktivierte den LHCGR etwa auf das 2,5-Fache der Basalaktivität, die S37-Derivate jedoch nicht.



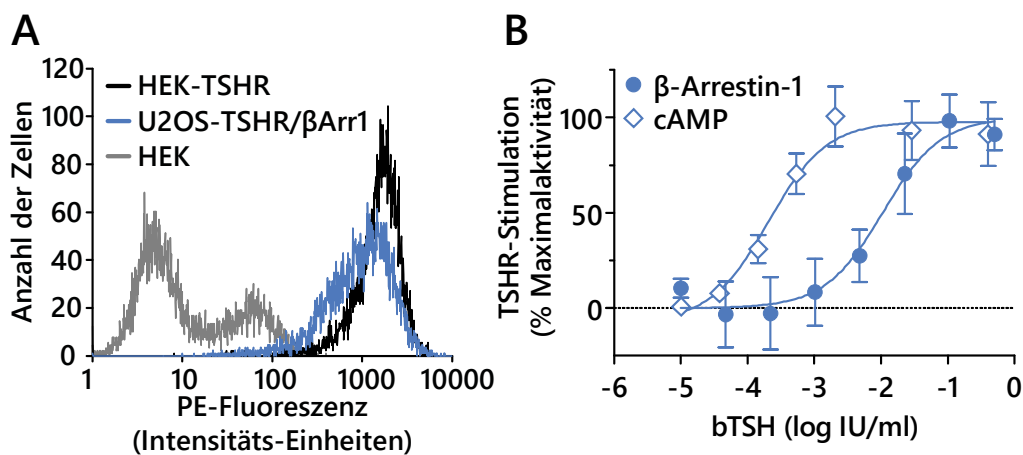
**Abb. 25. Die agonistische Wirkung von S37-Derivaten auf die Gonadotropin-Rezeptoren.** Die homologen Rezeptoren **TSHR**, **FSHR** und **LHCGR** sowie als Kontrolle der Klasse-B-GPCR **CRF<sub>1</sub>R** lagen in stabil transfizierten HEK-Zellen vor. Sie wurden mit 50 µM der angegebenen Substanzen, jedoch nicht mit dem Hormon behandelt. Die intrazelluläre cAMP-Akkumulation ist angegeben als das n-Fache der cAMP-Menge ohne Behandlung (y-Wert 1, gestrichelte Linie). S37a und die Derivate mit Substituenten am Phenylring 1 (rot) und 2 (grün) sowie K14 und Antag3 (grau) beeinflussten die Basalaktivität des **TSHR** unterschiedlich stark. Antag3 war ein inverser Agonist, S79 ist neutral. Die übrigen Substanzen sind schwache Agonisten. Der **FSHR** wurde durch keine der Verbindungen aktiviert, der **LHCGR** jedoch schwach von S37a, allerdings nicht von dessen Derivaten. **CRF<sub>1</sub>R** wird von den Substanzen nicht beeinflusst. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Doppelbestimmungen.

### 3.4.3 S37a hemmt die $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung nichtkompetitiv zu bTSH

Aufgrund der möglichen Bedeutung des TSHR für die Knochenhomöostase, sollte die Wirkung der Substanz S37a auf den  $\beta$ -Arrestin-1-Signalweg untersucht werden. Eine funktionelle Selektivität (*ligand bias*) von S37a in Richtung des cAMP-Signalwegs, also schwächerer Inhibition des  $\beta$ -Arrestin-1-Signalwegs, könnte dabei von Vorteil sein, weil einer möglichen Therapie-induzierten Osteoporose vorgebeugt würde.

Die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung wurde in der Osteosarkom-Zelllinie U2OS gemessen, die stabil mit TSHR und  $\beta$ -Arrestin 1 transfiziert war (U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1). Beide Proteine waren

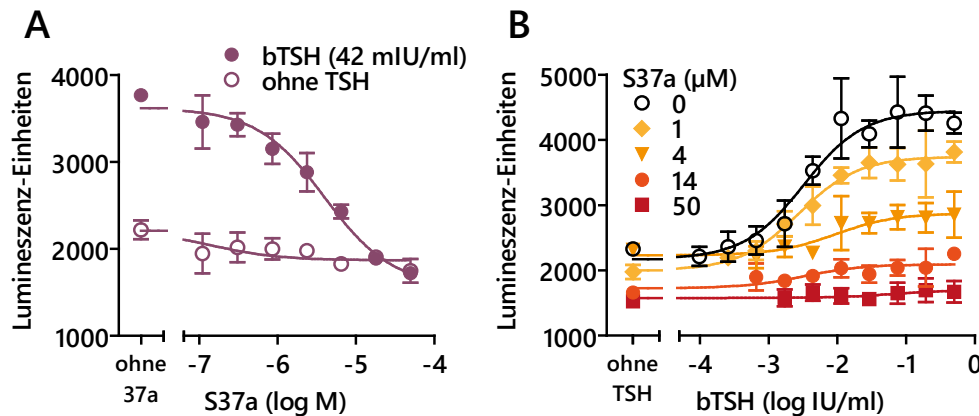
mit Enzymfragmenten markiert, sodass deren Interaktion durch Chemolumineszenz quantifiziert werden konnte. Die Zellen wurden zunächst mittels Durchflusszytometrie auf die TSHR-Expression überprüft (Abb. 26 A). Sie enthielten im Mittel ähnlich viel TSHR an der Zelloberfläche, wie die HEK-TSHR-Zellen, die Streuung war aber etwas breiter. Danach wurde sowohl die cAMP-Akkumulation als auch die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung nach Stimulation mit bTSH gemessen. Die normierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind zum Vergleich zusammen in einem Graphen dargestellt (Abb. 26 B). Die  $EC_{50}$  betrug für den cAMP-Signalweg 0,2 mIU/ml und war damit einerseits etwas niedriger, als in HEK-TSHR-Zellen (dort ca. 1 mIU/ml). Andererseits war die  $EC_{50}$  für die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung in U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1-Zellen (blaue Kreise in Abb. 26 B) mit 10,6 mIU/ml ca. 50-fach höher, als die für den cAMP-Signalweg.



**Abb. 26. Charakterisierung der U2OS-TSHR/ $\beta$ -Arrestin-1-Zellen.** **A:** Durchflusszytometrische Messung der Zelloberflächenrezeptoren. Stabil transfizierte U2OS-TSHR/ $\beta$ -Arrestin-1( $\beta$ Arr1)- bzw. HEK-TSHR-Zellen sowie nicht transfizierte HEK-Zellen wurden mit einem primären Maus-anti-TSHR-Antikörper und einem sekundären R-PE-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch mit 10000 Zellen je Probe. Die Histogramme zeigen die Anzahl der Zellen in 1000 logarithmischen Klassen der PE-Fluoreszenzintensität von 1 bis 10000. **B:** Vergleich der bTSH-abhängigen cAMP-Akkumulation (gemessen mittels RIA) und  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung (gemessen mittels PathHunter-Assay) in U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1-Zellen, normiert auf das jeweilige obere (100 %) und untere (0 %) Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die  $EC_{50}$  von bTSH ist für die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung im Vergleich zum cAMP-Signalweg 50-fach erhöht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei ( $\beta$ -Arrestin 1) bzw. vier (cAMP) Einzelmessungen.

Die errechnete  $EC_{80}$  von bTSH betrug 42 mIU/ml und wurde verwendet, um daraufhin die antagonistische Wirkung von S37a auf die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung zu messen (Abb. 27 A, gefüllte Kreise). S37a inhibierte den Effekt von bTSH hier vollständig bis zum basalen Signal von etwa 2000 Lumineszenz-Einheiten. Die  $IC_{50}$  lag bei 4  $\mu$ M. Ohne bTSH hatte S37a einen schwachen invers agonistischen Effekt.



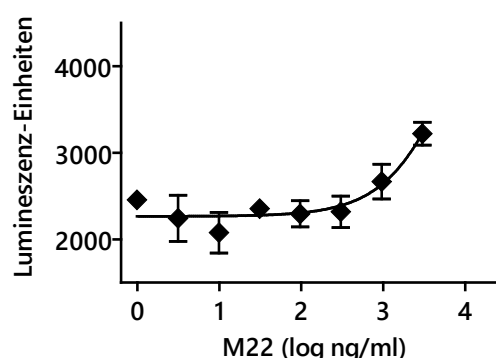


**Abb. 27. Inhibition der  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung durch S37a.** **A:** Konzentrations-Wirkungskurven von S37a mit bTSH-Stimulation (antagonistischer Effekt) und ohne TSH (invers agonistischer Effekt), gemessen mittels PathHunter-Assay in U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1-Zellen. **B:** U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1-Zellen wurden mit bTSH konzentrationsabhängig aktiviert und mit ansteigenden Konzentrationen des Antagonisten S37a behandelt. Der Maximaleffekt ( $E_{\max}$ ) war verringert, das heißt S37a wirkte nichtkompetitiv zu bTSH. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung von Triplikaten dargestellt.

Im Vergleich zum cAMP-Signalweg in HEK-TSHR-Zellen war die  $IC_{50}$  von S37a bei der  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung niedriger; gleichzeitig fehlte hier die partialagonistische Wirkung der Substanz ohne TSH-Stimulation (Vgl. Abb. 4 C).

Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass S37a nichtkompetitiv zu bTSH wirkte (Abb. 27 B). 50  $\mu$ M S37a inhibierten die Wirkung auch hoher bTSH-Konzentrationen bis 500 mIU/ml vollständig. Dieses Ergebnis war überraschend, weil es im Widerspruch zum vorher beobachteten kompetitiven Antagonismus derselben Liganden im cAMP-Assay steht (Vgl. Abb. 2).

Um die Relevanz der  $\beta$ -Arrestin-1-Inhibition durch S37a im Rahmen einer durch stimulierende Antikörper (TSAb) induzierte Hyperthyreose besser beurteilen zu können, wurde die Wirkung von M22 auf die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung gemessen (Abb. 28). Dieser zeigte erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von 1  $\mu$ g/ml eine Wirkung.



**Abb. 28. M22 aktiviert die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung am TSHR erst ab 1  $\mu$ g/ml.** Die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung nach steigenden Konzentrationen des monoklonalen humanen TSAb M22 wurde mittels PathHunter-Assay in U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr1-Zellen gemessen. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung von Triplikaten dargestellt.

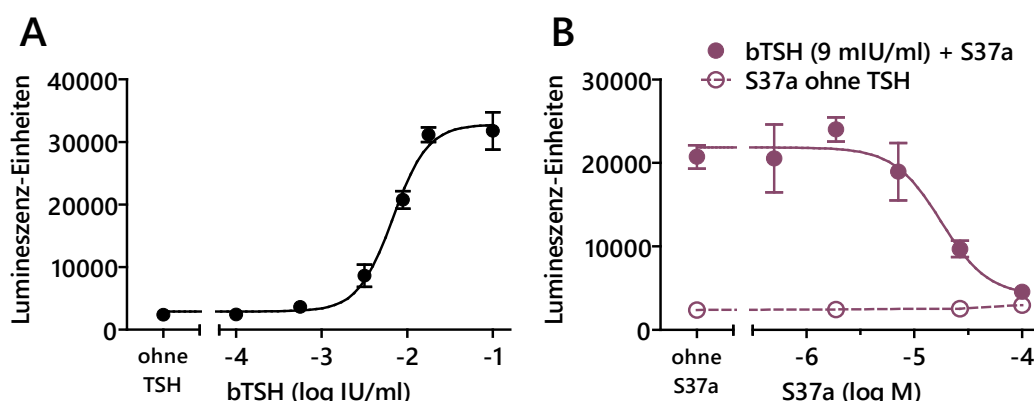
Diese Konzentration ist etwa 100-fach höher, als bei der cAMP-Akkumulation in HEK-TSHR-Zellen (Abb. 22 A). Die maximale  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung von ca. 4500 Lumineszenz-Einheiten, die durch bTSH ausgelöst wurde (schwarze Kurve in Abb. 27 B), wurde blieb bei M22 bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  deutlich unterschritten und es wurde keine Sättigung erreicht. Die Daten zeigen, dass M22 funktionelle Selektivität für den cAMP-Signalweg aufweist.

### 3.4.4 Inhibition der $G_{\alpha_q}$ -Protein-vermittelten Signaltransduktion am TSHR durch S37a

Die Wirkung von S37a auf die Signaltransduktion von  $G_{\alpha_q}$  wurde mithilfe eines Luciferase-Reportergen-Assays gemessen, der die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) in HEK-TSHR-Zellen misst.

NFAT konnte in stabil transfizierten HEK-TSHR-Zellen mit bTSH konzentrationsabhängig aktiviert werden (Abb. 29 A). Die  $EC_{50}$  war mit 9 mIU/ml etwa 9-fach erhöht im Vergleich zur  $G_{\alpha_s}$ -abhängigen cAMP-Akkumulation in derselben Zelllinie.

S37a war in der Lage, die durch bTSH induzierte NFAT-Aktivierung konzentrationsabhängig zu hemmen (Abb. 29 B). Die  $IC_{50}$  betrug 18  $\mu\text{M}$  und war damit ähnlich, wie im cAMP-Assay, wo jedoch weniger bTSH eingesetzt wurde. Im Gegensatz zum cAMP-Assay konnte für S37a im NFAT-Assay keine agonistische Wirkung gemessen werden.

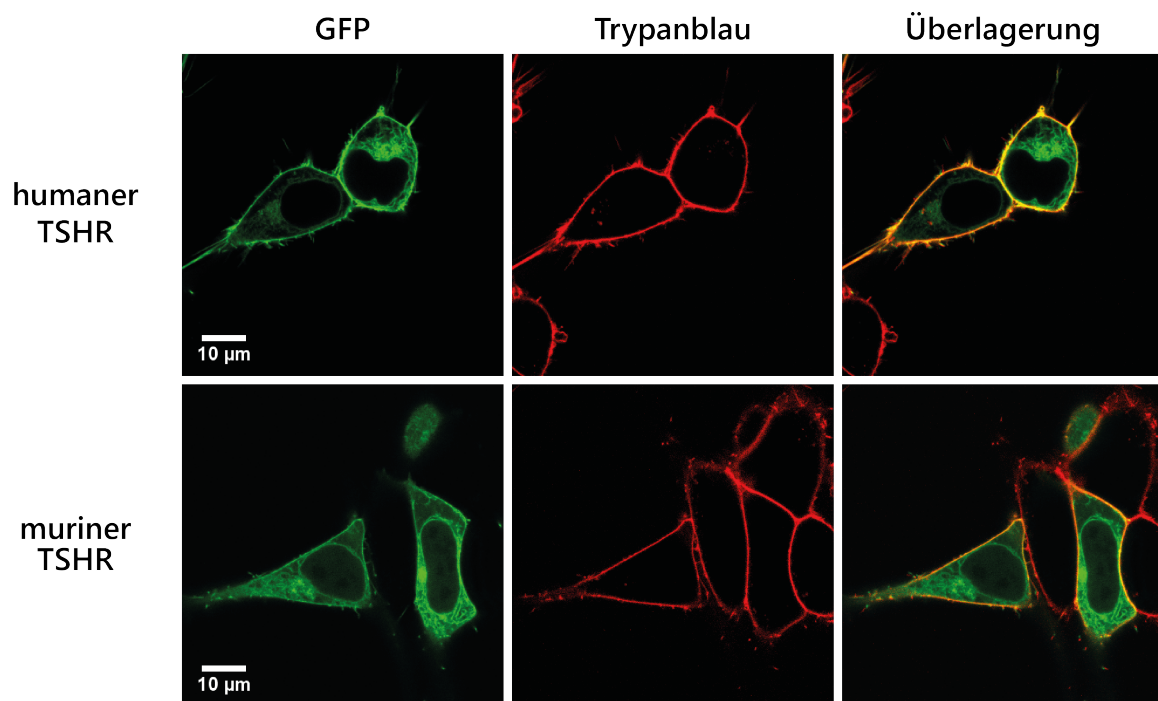


**Abb. 29. Einfluss von bTSH und S37a auf die Aktivität von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) in HEK-TSHR-Zellen.** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden transient mit NFAT-abhängigem Luciferase-Reportergen-Plasmid transfiziert und die Lumineszenz mit dem ONE-Glo-Assay nach Behandlung mit den jeweiligen Liganden in den angegebenen Konzentrationen gemessen. **A:** bTSH aktivierte NFAT konzentrationsabhängig. Die  $EC_{50}$  betrug 6,7 mIU/ml. **B:** S37a inhibierte die NFAT-Aktivierung in Anwesenheit von bTSH ( $EC_{80}$  = 9 mIU/ml) konzentrationsabhängig mit einer  $IC_{50}$  von 18  $\mu\text{M}$ . Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung von Triplikaten dargestellt.

### 3.4.5 Die Wirkung von S37a auf den murinen TSHR (mTSHR)

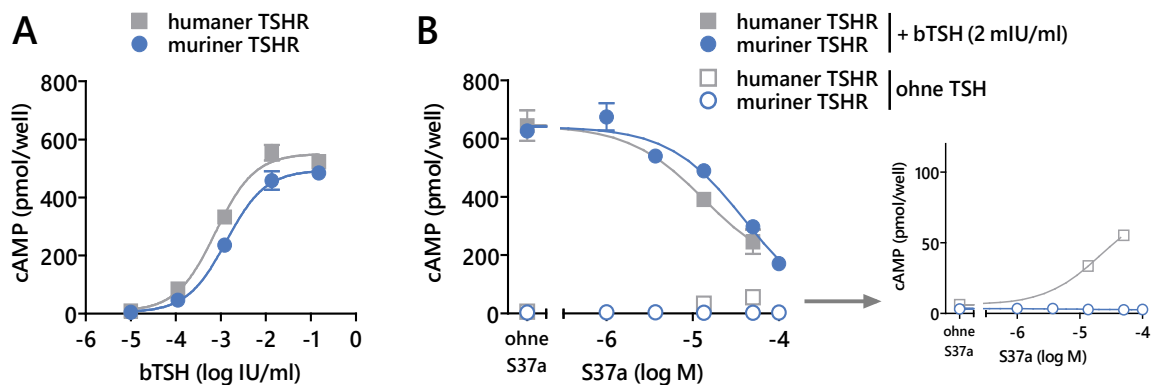
Um zu klären, ob S37a für *in-vivo*-Versuche in einem EO-Mausmodell geeignet ist, wurde die Wirkung der Substanz am mTSHR untersucht. Dieser wurde als GFP-Fusionsprotein transient in HEK-Zellen exprimiert. Der GFP-Tag am intrazellulären C-Terminus des TSHR ermöglichte es, die Lokalisation der Rezeptoren in den Zellen darzustellen (Abb. 30). Der mTSHR war ähn-

lich stark in HEK-Zellen exprimiert, wie der hTSHR. Beide wiesen sowohl deutliche GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran (gelb in der Überlagerung), als auch an intrazellulären Membranen (grün in der Überlagerung) auf.



**Abb. 30. Expressionsuntersuchung des murinen (m)TSHR in HEK-Zellen mittels LSM.** Die Zellen wurden mit cDNA des humanen bzw. murinen TSHR, jeweils mit C-terminalem GFP-Tag, jedoch ohne FLAG-Tag transient transfiziert. Die LSM-Bilder zeigen die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in grüner Farbe, die mit Trypanblau gefärbten Plasmamembranen rot. In der Überlagerung beider Kanäle zeigt eine Gelbfärbung die Kolo-kalisation beider Fluoreszenzen an der Plasmamembran an.

Die TSHR-exprimierenden HEK-Zellen wurden konzentrationsabhängig mit bTSH aktiviert (Abb. 31 A), wobei die  $EC_{50}$  im mTSHR mit 1,3 mIU/ml nur geringfügig höher war, als im hTSHR (0,8 mIU/ml). Die Zellen wurden anschließend mit 2 mIU/ml (ca.  $EC_{80}$ ) bTSH aktiviert und zusätzlich mit steigenden Konzentrationen S37a behandelt (Abb. 31 B). S37a inhibierte den mTSHR ähnlich stark, wie den hTSHR. Die  $IC_{50}$  betrug 40 µM im mTSHR, im hTSHR in diesem Versuch 14 µM.



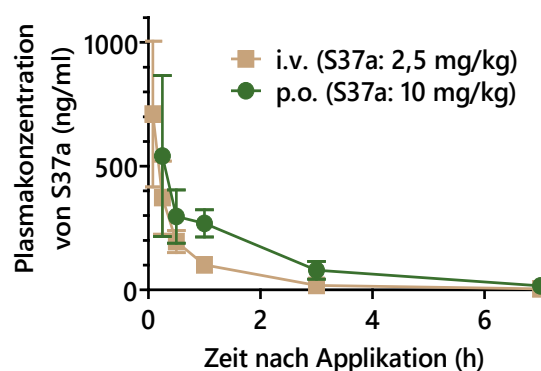
**Abb. 31. Vergleich der cAMP-Signaltransduktion von mTSHR und hTSHR.** **A:** mTSHR und hTSHR wurden transient in HEK-Zellen exprimiert und mit steigenden Konzentrationen bTSH die cAMP-Akkumulation aktiviert. Im mTSHR war die  $EC_{50}$  von bTSH etwas höher, als im hTSHR. **B:** Anschließend wurden die Zellen mit konstanter bTSH-Konzentration aktiviert und mit S37a inhibiert bzw. nur mit S37a behandelt. Die  $IC_{50}$  von S37a war im mTSHR ebenfalls etwas höher, als im hTSHR. Im Gegensatz zum hTSHR war S37a allein im mTSHR kein Agonist (umrandete Datenpunkte, Vergrößerung rechts). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten.

Der cAMP-Signalweg wird über mTSHR und hTSHR sehr ähnlich von bTSH aktiviert und von S37a inhibiert. Die Potenz ( $EC_{50}$  bzw.  $IC_{50}$ ) beider Liganden ist im mTSHR geringfügig niedriger. Überraschenderweise war S37a allein, also ohne Hormonbehandlung, im mTSHR kein partieller Agonist, wie es im hTSHR der Fall war (Abb. 31 B, rechts).

### 3.4.6 Pharmakokinetik von S37a in Mäusen

Die Pharmakokinetik-Untersuchungen wurden bei der Pharmacelsus GmbH (Saarbrücken) in Auftrag gegeben, um abschätzen zu können, ob in einem potenziellen EO-Mausmodell *in vivo* die erforderlichen S37a-Plasmakonzentrationen erreicht werden.

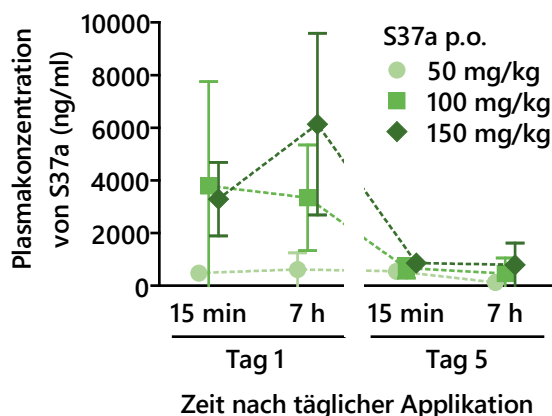
In einer initialen Studie wurden SWISS-(CD-1)-Mäusen niedrige Einzeldosen von 2,5 mg/kg Körpergewicht intravenös (i.v.) bzw. 10 mg/kg oral (*per os*, p.o.) verabreicht, um grundlegende pharmakokinetische Parameter zu bestimmen (Abb. 32). Die Plasmahalbwertszeit von S37a bei oraler Gabe betrug 2,9 Stunden im terminalen Gefälle der Kurve und war höher, als die nach intravenöser Gabe (1,2 Stunden). Anhand der Plasmakonzentrationen nach intravenöser und oraler Gabe, wurde eine orale Bioverfügbarkeit von 53 % für S37a ermittelt.



**Abb. 32. Pharmakokinetik von S37a in Mäusen nach einmaliger Applikation.** Dargestellt ist die S37a-Plasmakonzentration über die Zeit nach intravenöser (i.v.) und oraler (p.o.) Applikation einer niedrigen Dosis. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Tieren.

In einer zweiten Studie wurden fünf Tage lang täglich höhere orale Dosen (50, 100 und 150 mg je kg Körpergewicht) verabreicht (Abb. 33). Am ersten und letzten Tag der Studie wurde jeweils 15 Minuten und 7 Stunden nach der Applikation Blut entnommen und die Plasmakonzentrationen gemessen.

Bei den Dosierungen 100 und 150 mg/kg war die Konzentration von S37a im Plasma deutlich höher, als bei der 50-mg/kg-Dosis, nämlich im Mittel zwischen 3000 und 4000 ng/ml (1000 ng/ml entsprechen einer S37a-Konzentration von ca. 2,2  $\mu$ M). Bei der höchsten Dosis stieg die Plasmakonzentration nach sieben Stunden sogar noch an und betrug dann im Mittel rund 6000 ng/ml, das sind etwa 13  $\mu$ M S37a. Die Substanz wurde von den Mäusen auch bei der höchsten Dosis gut toleriert. Es wurden keine unerwünschten klinischen Zeichen beobachtet und das Körpergewicht der Tiere blieb über den Zeitraum der Studie konstant. Nach fünf Tagen lag die Plasmakonzentration sowohl 15 Minuten als auch 7 Stunden nach der Applikation bei allen Dosierungen im Mittel unter 1000 ng/ml. Die Variationskoeffizienten der drei Tiere je Zeitpunkt lagen im Mittel bei 60 %.



**Abb. 33. Pharmakokinetik nach wiederholter Applikation höherer oraler S37a-Dosierungen.** Den Tieren wurde über fünf Tage einmal täglich S37a oral (p.o.) verabreicht. An Tag 1 und 5 wurde anschließend nach 15 Minuten und 7 Stunden die Plasmakonzentration gemessen. Ab einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht stieg die mittlere Plasmakonzentration über 3000 ng/ml, bei 150 mg/kg auf etwa 6000 ng/ml nach 7 Stunden. Am fünften Tag lag die Plasmakonzentration bei allen Dosierungen im Mittel unter 1000 ng/ml. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Mäusen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die orale Gabe von 150 mg/kg in Mäusen Plasmakonzentrationen in der Nähe der  $IC_{50}$  von S37a erreicht werden können. Diese Konzentrationen werden jedoch bei täglicher Gabe nicht über eine Dauer von fünf Tagen aufrechterhalten.

Unabhängig von den beschriebenen Studien wurde, ebenfalls von der Pharmacelsus GmbH, die Plasma-Proteinbindung von S37a in gepooltem Mäuseplasma bestimmt. Sie betrug 94 % und war damit höher, als die der Referenzverbindung Warfarin (88 %).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der hoch selektive TSHR-Antagonist S37, insbesondere seine strukturelle Interaktion mit dem Rezeptor und sein therapeutisches Potenzial für die Endokrine Orbitopathie (EO), im Detail charakterisiert. Die Überaktivierung des TSHR durch aktivierende Autoantikörper (TSAb) spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der EO (Bahn, 2015). Die derzeitige Therapie der EO erfolgt nicht kausal am TSHR und ist daher oft langwierig, komplex und mit chirurgischen Eingriffen verbunden (Eckstein *et al.*, 2016). Die Inhibition der Überaktivierung direkt am TSHR stellt einen zentralen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer verbesserten Therapie der EO dar und war darum die Motivation für die Durchführung eines zellbasierten Hochdurchsatz-Screenings für TSHR-Antagonisten in unserer Arbeitsgruppe. Durch das Screening und anschließende stereoselektive Synthese wurde der TSHR-Antagonist S37 identifiziert, welcher nicht die homologen Gonadotropin-Rezeptoren FSHR und LHCGR inhibierte (Hoyer, 2014). Im Gegensatz zu anderen bisher beschriebenen TSHR-Antagonisten (Übersicht: Krause, Marcinkowski, 2018) stellte dies einen Vorteil dar, weil bei der Entwicklung eines potenziellen Arzneistoffs die zu erwartenden Nebenwirkungen auf das gonadotrope System vermieden werden. Die vorliegende Arbeit erweitert das bisherige Wissen über S37 um Ergebnisse zu Potenzial und Limitationen von S37 für die EO-Therapie. Dabei ist vor allem hervorzuheben, dass das *proof of principle* erbracht wurde, dass S37 die TSHR-Aktivierung durch monoklonale TAb und durch TSHR-aktivierende Seren von EO-Patienten hemmte. Die Substanz inhibierte auch den murinen TSHR und die Aktivierung eines murinen TAb. Zudem zeigten initiale Pharmakokinetik-Studien in Mäusen, dass bei oraler Gabe vorübergehend pharmakologisch wirksame Plasmaspiegel erreicht wurden, was die Eignung von S37 für die Durchführung kurzfristiger *in-vivo*-Studien darlegt.

Zusätzlich zu den krankheitsrelevanten Fragestellungen wurde die Bindungsstelle von S37 an der Schnittstelle der Ektodomäne und der Transmembrandomäne (TMD) des TSHR identifiziert. Durch die experimentelle Charakterisierung der S37a-TSHR-Kontakte in Verbindung mit dem TSHR-Homologiemodell konnte dieses verfeinert werden. Dies ermöglichte ein detailliertes Verständnis der intramolekularen Signalweiterleitung an der extrazellulären Helix der Hinge-Region (EH) über internen Agonisten im Zusammenspiel mit den extrazellulären Loops (ECL) zur TMD. Zunächst wurde mithilfe trunkierter TSHR-Konstrukte sowie mittels LRRD/Hinge-TMD-Chimären von TSHR und FSHR die Bindungsstelle von S37 auf die TMD eingegrenzt, womit die vorherige Vermutung, dass S37 an der Ektodomäne oder sogar LRRD bindet, widerlegt wurde. Die Substanz wurde in die beiden Enantiomere getrennt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nur das aktive Enantiomer S37<sub>a</sub> am TSHR wirkt und eine stärkere Hemmung der TSH-induzierten Aktivität des TSHR aufweist, als das Racemat. Das gegenteilige Enantiomer S37<sub>b</sub> ist nahezu inaktiv. Die absolute Konfiguration der Struktur von S37<sub>a</sub> wurde initial durch eine Kombination aus CD-Spektroskopie und -Vorhersage mittels DFT-Berechnungen vorhergesagt und später unabhängig davon mittels Röntgenkristallografie bestätigt.

Durch die Untersuchung der Wirkungen von S37a auf bekannte konstitutiv aktivierende Mutationen (CAM) und neutrale Mutationen des TSHR konnte in Verbindung mit *Docking*-Studien eine Bindungsstelle zwischen dem extrazellulären Loop (ECL) 1, dem internen Agonisten und der extrazellulären Helix (EH) identifiziert werden. Zusammen mit in dieser Arbeit durchgeführten Struktur-Funktionsanalysen (SAR) wurden die Grundlagen für die Entwicklung weiterer selektiver TSHR-Antagonisten mit höherer Affinität geschaffen.

#### 4.1 Eingrenzung der Bindungsstelle von S37a

Ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) kann die Informationen verschiedener Liganden oder Ligandenkonzentrationen integrieren und durch sehr spezifische Konformationsänderungen unterschiedliche intrazelluläre Effektoren, wie G-Proteine,  $\beta$ -Arrestine und GPCR-Kinasen bzw. zum Teil deren jeweilige Isoformen ansteuern (Manglik, Kruse, 2017; Reiter *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Nur für wenige GPCR sind Kristallstrukturen sowohl im inaktiven, als auch im aktiven Zustand bekannt und für die spezifischen Konformationen, die für G-Protein- oder  $\beta$ -Arrestin-Selektivität (*biased signalling*) verantwortlich sind, sind Strukturdaten kaum verfügbar (Manglik, Kruse, 2017). Für Glykoprotein-hormon-Rezeptoren (GPHR) wie TSHR liegt keine Kristallstruktur für die Transmembrandomäne vor. Insbesondere im Gegensatz zu GPCR mit kleinen Liganden, die in der Transmembrandomäne (TMD) binden, ist der Mechanismus der Rezeptoraktivierung in GPHR durch die extrazelluläre Bindung des Glykoprotein-hormons verschieden: Die Ektodomäne wirkt als inverser Agonist auf die TMD (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002). Durch die Bindung des Hormons wird diese Inhibition aufgelöst und der Rezeptor wird, vermittelt über die extrazelluläre Helix (EH) der *Hinge*-Region sowie den internen Agonisten, welche über Disulfidbrücken verbunden sind, aktiviert (Brüser *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2001, 2008; Kleinau *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2012).

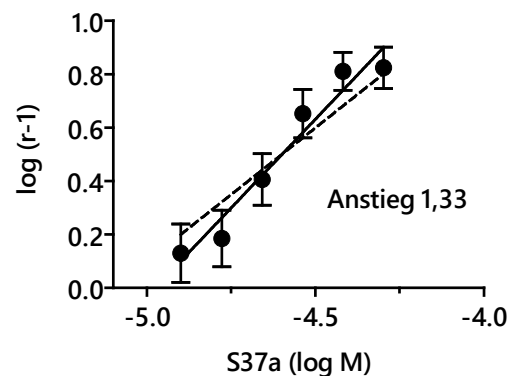
##### 4.1.1 Allosterische Wirkungen von S37 am gesamten TSHR

Zu Beginn der Arbeit wurde vermutet, dass S37 kompetitiv zu bTSH wirkt (Hoyer, 2014; siehe Abb. 2 B), was bedeutet, dass bTSH in höheren Konzentrationen trotz Anwesenheit von S37 die maximale cAMP-Akkumulation induzieren konnte, S37 also möglicherweise vom Rezeptor verdrängt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass S37a die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung nichtkompetitiv zu bTSH hemmte (Abb. 27), was zeigt, dass S37a auch bei hohen TSH-Konzentrationen eine Wirkung am Rezeptor haben kann, also nicht von bTSH verdrängt wird. Dabei wurde es als vernachlässigbar angenommen, dass cAMP mit dem Racemat S37 und die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung mit dem aktiven Enantiomer S37a durchgeführt wurde. Es konnte auf der anderen Seite auch bestätigt werden, dass S37a seinerseits radioaktives bTSH nicht vom TSHR verdrängt (Abb. 13).

Bei der Schild-Regression wird die  $EC_{50}$ -Verschiebung gegen die Antagonisten-Konzentration aufgetragen und eine lineare Kurvenanpassung durchgeführt (Arunlakshana, Schild, 1959), wobei ein Anstieg von 1 auf kompetitiven Antagonismus hinweist. Die Schild-Regression wurde

zuvor für S37 und bTSH anhand von cAMP-Messungen berechnet (Hoyer, 2014). Der Anstieg der Geraden betrug 1,33 (siehe Abb. 34). Passt man die Kurve mit einem Anstieg von 1,0 an (gestrichelte Linie) folgt die  $EC_{50}$ -Verschiebung bei den höchsten S37-Konzentrationen (38 und 50  $\mu$ M) nicht dem Trend. Die  $EC_{50}$ -Werte ändern sich geringfügiger (Anstieg  $< 1$ ) und würden wahrscheinlich über 50  $\mu$ M S37 ein Limit erreichen.

Das Erreichen der maximalen Rezeptoraktivität in Anwesenheit des Antagonisten sowie eine Rechtsverschiebung der  $EC_{50}$  sind nicht ausreichend, um Kompetitivität zu beweisen (Christopoulos, Kenakin, 2002). Auch bei allosterischen Modulatoren kann die maximale Rezeptoraktivität erreicht werden, wobei anhand der Abweichung von der Schild-Regression ermittelt werden kann, ob zwischen den beiden Liganden positive oder negative Kooperativität vorliegt (Ehlert, 1988). Ein Abflachen der Kurve, wie es sich für S37 in Abb. 34 andeutet, spräche für negative Kooperativität, was bedeuten würde, dass höhere S37-Konzentrationen die Affinität von TSH reduzieren, obwohl beide Liganden an verschiedenen Stellen binden.



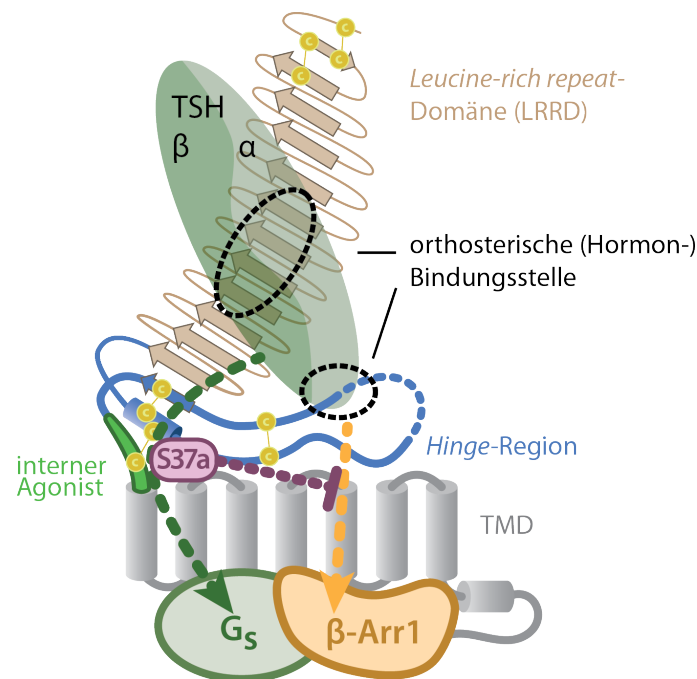
**Abb. 34. Schild-Regression für die Interaktion von S37 und bTSH am TSHR.**  $EC_{50}$ -Verschiebung der bTSH-Konzentrations-Wirkungskurven für die cAMP-Akkumulation in HEK-TSHR-Zellen durch verschiedene Konzentrationen S37.  $r$  ist der Quotient der  $EC_{50}$  mit S37 und der  $EC_{50}$  ohne S37. Gezeigt ist die lineare Kurvenanpassung (Anstieg 1,33) im Vergleich zum Anstieg eines idealen kompetitiven Antagonisten (Anstieg 1, gestrichelt). Die Fehlerbalken geben Standardfehler der  $EC_{50}$ , ermittelt aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 8 Punkten in Doppelbestimmung, an (Abb. geändert aus der Dissertation von Hoyer, 2014).

Die Abweichungen von der idealen Schild-Regression sind zwar subtil und beweisen für sich betrachtet keine allosterische Wirkung; da jedoch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass S37 an der TMD des TSHR bindet, ist eine negative Kooperativität zwischen der Bindungsstelle von S37 an der TMD und der von TSH an der Ektodomäne (möglicherweise vermittelt über den internen Agonisten und die extrazelluläre Helix) wahrscheinlich.

Im Gegensatz zur cAMP-Akkumulation nimmt die maximale  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung mit steigenden S37a-Konzentrationen ab. Diese nichtkompetitive Wirkung ließe sich erklären, wenn man verschiedene intramolekulare Signal-Pfade für  $G_s$  und  $\beta$ -Arrestin 1 annimmt (Abb. 35). Da sich durch cAMP-Messungen an TSHR-Varianten gezeigt hat, dass S37a wahrscheinlich in der Nähe des internen Agonisten bindet (Abb. 15 und 16), wäre es möglich, dass die  $G_s$ -Rekrutierung über diesen Pfad induziert wird. Die enge Assoziation des internen Agonisten über Disulfide zur EH und LRRD könnten an dieser Stelle eine durch diese Strukturbestandteile vermittelte negativ



kooperative Wirkung von S37 und TSH hervorrufen, während die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung wie bei GPCR vermutet über andere spezifische Konformationsänderungen (Manglik, Kruse, 2017) hervorgerufen wird, die durch andere TSH-Kontaktstellen ausgelöst werden.



**Abb. 35. Schematische Darstellung möglicher räumlich getrennter intramolekularer Signal-Pfade für  $G_s$  und  $\beta$ -Arrestin 1 im TSHR.** Der grün gestrichelte Pfad löst die Kopplung von  $G_s$  aus. S37a könnte in die an diesem Pfad beteiligten Strukturen, wie den internen Agonisten und die extrazelluläre Helix (EH) sterisch beeinflussen und so die negative Kooperativität zu TSH bewirken. Der blau gestrichelte Pfad induziert die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung über andere Kontaktstellen von TSH, die nicht kooperativ mit der Bindung von S37a in Verbindung stehen.

Die verschiedenen pharmakologischen Muster könnten auch durch Unterschiede der cAMP- und  $\beta$ -Arrestin-Signaltransduktion von internalisierten TSHR hervorgerufen werden (Calebiro et al., 2009; Neumann et al., 2010), da S37 aufgrund dessen Lipophilie im Gegensatz zu TSH auch an bereits internalisierte TSHR binden könnte.

Es wurde beschrieben, dass die maximale Wirkung des orthosterischen Liganden erst dann durch allosterische Modulatoren herabgesetzt wird, wenn die Rezeptorreserve erschöpft ist (Stephenson, 1997). Die Unterschiede könnten daher auch Artefakte durch die Verwendung der verschiedenen Zelltypen sein (Die TSHR-Expression in U2OS-TSHR/ $\beta$ Arr-Zellen war im Vergleich zu HEK-TSHR-Zellen etwas niedriger, siehe Abb. 26).

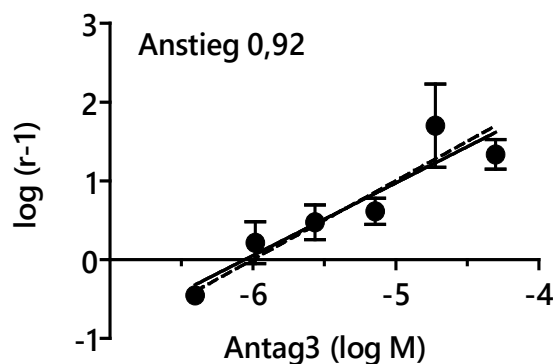
#### 4.1.2 Allosterische Wirkungen von S37 an trunkierten TSHR-Konstrukten

Die durch den niedermolekularen Agonisten C2 induzierten N-terminal trunkierten TSHR-Konstrukte wurden ebenfalls durch S37 inhibiert. Damit wurde bestätigt, dass die Bestandteile der Ektodomäne nicht unbedingt notwendig für die Bindung der Substanz sind, S37 also an der TMD des TSHR bindet (Abb. 8). In einem unabhängigen Versuchsaufbau auf Grundlage von TSHR-FSHR-Chimären mit jeweils vertauschtem LRRD- bzw. Hinge-TMD-Bereich wurde auch

für das aktive Enantiomer S37a bestätigt, dass es nicht an der TSHR-LRRD bindet. Dass die Plasmamembran-Expression solcher TSHR-Konstrukte sowie deren Funktionalität im Sinne der  $G_s$ -Signaltransduktion erhalten bleibt, wurde zuvor in anderen Publikationen gezeigt (TSHR-Trunkierungen: Neumann *et al.*, 2009; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002; TSHR-FSHR-Chimären: Schaarschmidt *et al.*, 2014). Dies war Voraussetzung für die Behandlung mit den jeweiligen Liganden und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 6, 10 und 11). Die Chimäre aus der gesamten TSHR-Ektodomäne und der FSHR-TMD konnte aufgrund der zu geringen Plasmamembran-Expression nicht verwendet werden (Schaarschmidt *et al.*, 2014). Das trunkierte Konstrukt GFGQ-TSHR entspricht annähernd der B-Untereinheit des TSHR, wie sie nach intramolekularer Spaltung und Abstoßung der A-Untereinheit auf der Oberfläche von Thyreozyten vorkommt und deren Funktionalität betreffend der cAMP-Basalaktivität bekannt ist (Rapoport, McLachlan, 2016, 2018). Das Konstrukt KNQK-TSHR war ebenfalls in der Lage,  $G_s$  zu aktivieren, war jedoch am schwächsten an der Plasmamembran exprimiert (Abb. 6C). Alle trunkierten Konstrukte hatten eine verringerte Plasmamembran-Expression, wahrscheinlich durch vermehrte Fehlfaltung, die durch das Qualitäts-Kontrollsystem des frühen zellulären Sekretionsweges erkannt werden (Anelli, Sitia, 2008). Der Grund für die erhöhte  $IC_{50}$ , also verringerte Affinität von S37 im kürzesten Konstrukt EDI im Vergleich zu KNQK- und GFGQ-TSHR könnte einerseits sein, dass in EDI-TSHR der interne Agonist nicht vollständig vorhanden ist und dessen Struktur so verändert ist, dass S37 nicht optimal binden kann oder andererseits, dass die Aminosäure E404 direkt vor dem internen Agonisten fehlt. Diese wurde als eine der beiden wahrscheinlichen polaren Kontakte identifiziert und wäre demnach für die optimale Bindung von S37 nötig (Abb. 16). Allerdings war in allen trunkierten Konstrukten die Affinität von S37 höher, als im wt-TSHR. Möglicherweise erlauben die trunkierten TSHR einen erleichterten den Zugang von S37 zur idealen Bindungsstelle zur Herstellung des inaktiven Zustands des Rezeptors. Der Grund dafür könnte die EH sein, welche in den trunkierten TSHR fehlt und im Gegensatz dazu im wt-TSHR den Zugang von S37 in die optimale Bindungsposition stört. Das würde bedeuten, dass S37 zwar Kontakt zur Ektodomäne (wahrscheinlich zur EH) hat, diese jedoch nicht zur Affinität von S37 beiträgt. In diesem Zusammenhang wäre es plausibel, dass S37 die inhibierende Funktion der Ektodomäne auf die TMD (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002) in geringem Maße aufhebt, wodurch der schwache partielle Agonismus der Substanz zu erklären ist, der in den trunkierten TSHR fehlt (Abb. 7 B). Im wt-TSHR könnte eine sterische Wirkung von S37 zu einer Verschiebung der EH führen, welche vermittelt über die Disulfidbrücke C283-C398 (Ho *et al.*, 2001, 2008) die Bindung von TSH indirekt beeinflusst. Dies würde den beobachteten negativ kooperativen Effekt von S37 auf bTSH (Abb. 34) unterstützen.

Für den allosterischen Agonisten C2 ist bekannt, dass er in der allosterischen Bindungstasche des TSHR zwischen TMH 3, 5 und 6 bindet (Neumann *et al.*, 2016), analog zur ursprünglichen orthosterischen Bindungstasche Rhodopsin-ähnlicher GPCR (Wacker *et al.*, 2017). S37 wirkt nichtkompetitiv zu C2, was vorher am gesamten TSHR gezeigt wurde (Hoyer, 2014; Abb. 2 C) und in der vorliegenden Arbeit am trunkierten TSHR-Konstrukt EDI, das nur aus der TMD und

einem Teil des internen Agonisten besteht, bestätigt wurde (Abb. 9 A). Dies deutet darauf hin, dass an der TMD eine zweite allosterische Bindungstasche vorhanden sein muss. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Affinität von C2 durch die Verkürzung der TSHR-Ektodomäne nicht verändert wurde (Abb. 7 C), wie es bei S37 der Fall war (Abb. 8), C2 also im Gegensatz zu S37 nicht in direktem Kontakt mit der Ektodomäne ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der inverse Agonist Antag3, ein Derivat des allosterischen Agonisten C2, kompetitiv zu diesem wirkt (Abb. 9 B), was die Validität des Kompetitivitäts-Assays in EDI-TSHR unterstützt. Die Schild-Regression mit einem Anstieg von 0,92 ist sehr ähnlich zu einem idealen kompetitiven Antagonisten (Abb. 36). Interessanterweise ist die erste  $EC_{50}$ -Verschiebung negativ, das heißt geringe Antag3-Konzentrationen haben einen positiv kooperativen Effekt auf die C2-Affinität. Es wäre möglich, dass dieses Phänomen über TSHR-Homodimere, oder -Oligomere ausgelöst wird. Der TSHR di- oder oligomerisiert wahrscheinlich über die TMD und im Fall von TSH ist bekannt, dass sich dessen Bindung an einem Protomer negativ kooperativ auf die TSH-Bindung an dem/den anderen Protomer/en auswirkt (Urizar *et al.*, 2005; Zoenen *et al.*, 2012).



**Abb. 36. Schild-Regression für die Interaktion von Antag3 und C2 am trunkierten TSHR-Konstrukt EDI.**  $EC_{50}$ -Verschiebung der bTSH-Konzentrations-Wirkungskurven für die cAMP-Akkumulation in HEK-TSHR-Zellen durch verschiedene Konzentrationen Antag3.  $r$  ist der Quotient der  $EC_{50}$  mit Antag3 und der  $EC_{50}$  ohne Antag3. Gezeigt ist die lineare Kurvenanpassung (Anstieg 0,92) im Vergleich zum Anstieg eines idealen kompetitiven Antagonisten (Anstieg 1, gestrichelt). Diese sind sehr ähnlich. Die  $EC_{50}$  und Standardfehler wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven in Abb. 9 B ermittelt.

#### 4.1.3 TSHR-S37a-Interaktion in CAM

Für einige GPCR wurden negative allosterische Modulatoren (NAM) identifiziert, die nicht in der Bindungsstelle zwischen den TMH binden, sondern an allosterischen Bindungsstellen an der TMD, z.B. Cyclopamin am *Smoothed*-Rezeptor an der extrazellulären Seite der TMH 1, 6 und 7 (Weierstall *et al.*, 2014) und BPTU am  $P2Y_1$ -Rezeptor an der Grenzfläche zwischen TMD und Membran (Zhang *et al.*, 2015; Überblick: Wacker *et al.*, 2017). Für den TSHR waren vergleichbare Bindungsstellen bisher nicht bekannt.

Um die unbekannte Bindungsstelle für S37a näher einzugrenzen, wurden TSHR-Varianten mit verschiedenen konstitutiv aktivierenden Mutationen (CAM) in der TMD, den ECL und der Hinge-Region mit der Substanz behandelt. Unabhängig davon, dass Mutationen die Struktur des verändern können, induzieren CAM aktive Konformationen des Rezeptors, sodass dieser ohne

die Bindung von Agonisten intrazelluläre Signalwege anschaltet (Kleinau, Biebermann, 2014). Da TSHR-CAM in den ECL und der Hinge-Region besonders stark von S37a inhibiert wurden (Abb. 15), konnte angenommen werden, dass die Substanz in dieser Region die intramolekulare Signalweiterleitung behindert, während dies bei CAM in der TMD nicht der Fall war. Durch die Eingrenzung der Bindungsregion konnte die Kristallstruktur des aktiven Enantiomers S37a, die zu der Zeit bereits zur Verfügung stand, in das TSHR-Modell zwischen ECL 1 und internem Agonisten gedockt werden (Abb. 16 A). Dies war plausibel, weil sich in räumlicher Nähe die getesteten CAM S281 in der EH, N406D im internen Agonisten und I486F im ECL 1 befanden, für die auch eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung von der Ektodomäne zur TMD nachgewiesen wurde (Kleinau *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2012; Schaarschmidt *et al.*, 2016).

Da S37a selbst ein partieller Agonist ist, konnte die cAMP-Akkumulation bei der Testung der CAM auch ohne TSH-Behandlung gemessen werden, was die Anzahl anderer einflussnehmender Größen reduzierte. Da die CAM aber selbst die Funktion des TSHR stark beeinflussen, ist der Versuch dadurch limitiert, dass die Art und Weise, wie S37a in die veränderte Funktion eingreift, schwer vorherzusagen ist. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen an den stark von S37a inhibierten CAM S281Q, N406D, I486F, I568T und V656F könnte sein, dass diese Positionen im wt-TSHR für die enge Interaktion der antagonistisch wirkenden Ektodomäne mit der TMD verantwortlich sind (Schaarschmidt *et al.*, 2016; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002). Durch die CAM wird diese Interaktion gelockert, wodurch S37a möglicherweise relativ ungehindert in seine „optimale“ Bindungsposition gelangen kann. Dadurch wird die Substanz zum inversen Agonisten, ähnlich wie in den trunkierten TSHR ohne komplette Ektodomäne.

Auf die CAM L645V hatte S37a kaum Einfluss, was für einen Verlust einer Kontaktstelle zur Substanz an dieser Position sprechen könnte; da sich L645 jedoch im TSHR-Modell nicht in der Nähe zu S37a befindet, wird dies nicht angenommen. In allen anderen CAM in der TMD verhielt sich S37a wie im wt-TSHR als partieller Agonist, weswegen hier keine Interaktion angenommen wurde. Die zuvor beschriebene erhöhte Basalaktivität für R310C (Russo *et al.*, 2000), wurde in unserem Versuch nicht bestätigt, wie auch Mueller *et al.*, 2009 gezeigt haben.

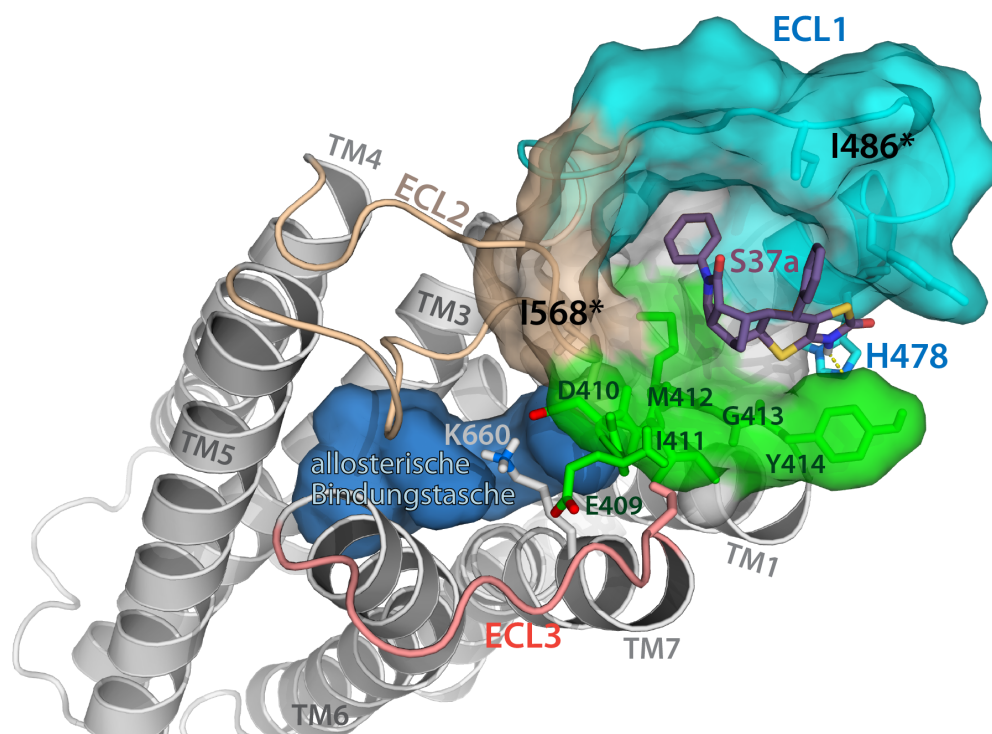
## 4.2 Verifizierung der Bindungsstelle von S37a mittels modellgestützter Mutagenese

### 4.2.1 Docking-Position von S37a im trunkierten TSHR-Konstrukt EDI

Anhand der Docking-Position von S37a im initialen TSHR-Modell (Abb. 16 A) wurden verschiedene Positionen für die Mutagenese ausgewählt, die in räumlicher Nähe zu S37a lagen, wie E404 (Hinge-Region), H478, E480 (TMH 2 / ECL 1) und Y414 (interner Agonist) oder weiter entfernt, aber an der Grenzfläche von TMD und Ektodomäne lagen (S567, ECL 2 und S657, ECL 3). Da die mutierten TSHR-Varianten E404A und H478A nicht mehr durch S37a inhibiert werden konnten (Abb. 16 B), wurden diese als mögliche Kontaktpunkte für S37a identifiziert. Zunächst wurde das TSHR-Modell für die TSHR-TMD entsprechend dem trunkierten Konstrukt EDI in

Verbindung mit der *Docking*-Position von S37a verfeinert, da die Substanz auch in diesem Konstrukt ohne Ektodomäne aktiv war (Abb. 37). Die Substanz ist eingebettet zwischen ECL 1 und internem Agonisten und liegt in räumlicher Nähe zu I486 im ECL 1 und wahrscheinlich zu I568 im ECL 2, deren CAM stark von S37a inhibiert wurden. Eine polare Interaktion zwischen dem Amin von S37a und Histidin H478 ist dargestellt. In EDI-TSHR ist der interne Agonist nur unvollständig vorhanden und das direkt davor gelegene E404 fehlt. Das könnte der Grund für die geringere Affinität von S37a in EDI-TSHR im Vergleich zu GFGQ- und KNQK-TSHR sein, wo E404 vorliegt. Dennoch unterstützt das Modell, dass S37a auch ohne die Ektodomäne an der TSHR-TMD (inklusive eines Teilstückes des internen Agonisten, grün in Abb. 37) binden kann.

Zusätzlich ist erkennbar, dass die Bindungsstelle von S37 nicht mit der bekannten allosterischen Bindungsstelle (dunkelblau in Abb. 37) überlappt, die der orthosterischen Bindungstasche anderer GPCR entspricht und außerdem nicht den Bindungsstellen anderer NAM in anderen GPCR ähnelt (Wacker *et al.*, 2017).



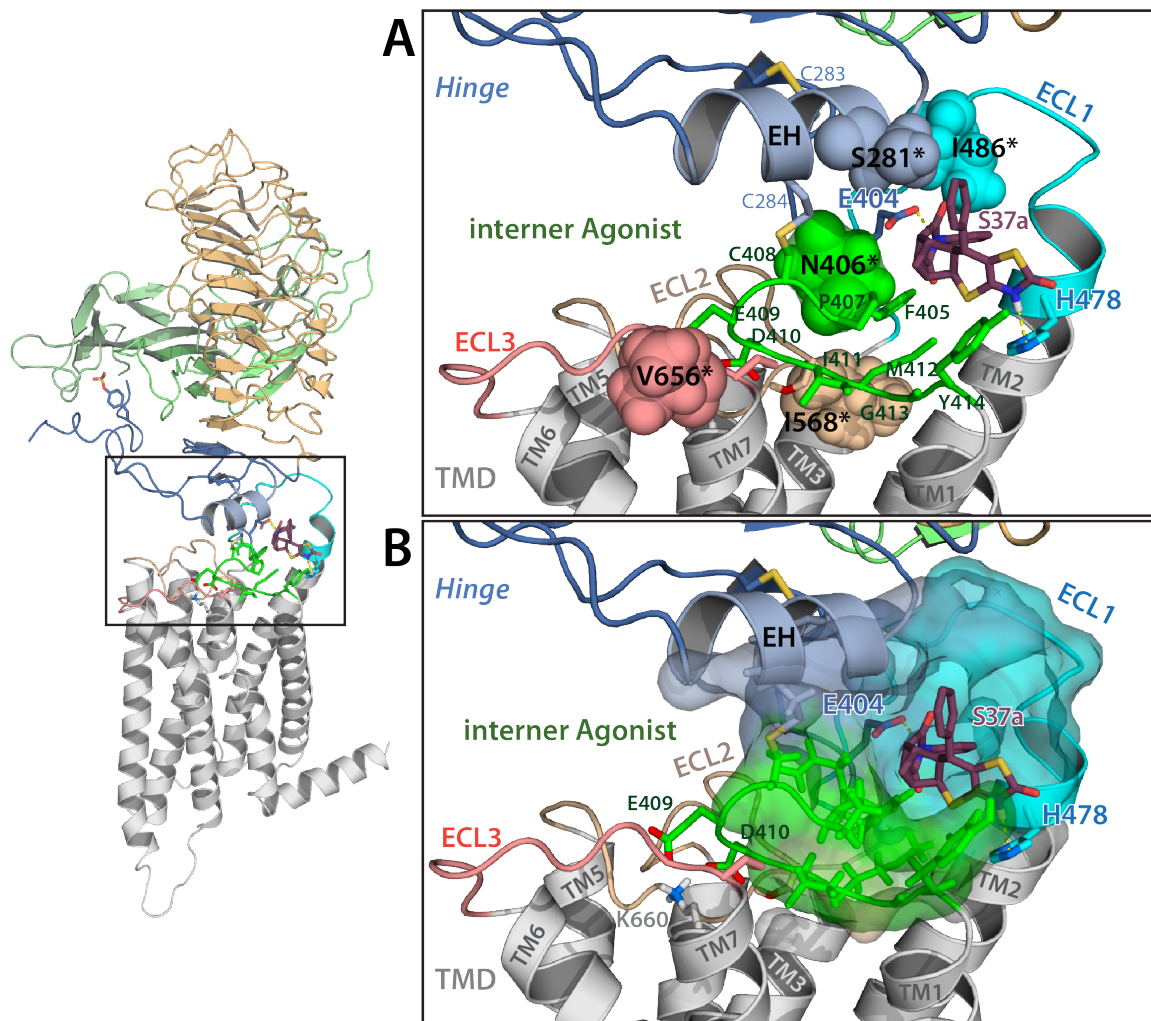
**Abb. 37. Docking von S37a in das Homologiemodell des truncierten TSHR-Konstrukts EDI.** S37a (violett) befindet sich in einer Bindungstasche an der extrazellulären Seite der TMD zwischen den ECL 1 (cyan) und 2 (hellbraun) sowie dem Teil des internen Agonisten (grün) ab E409 und interagiert mit H478 am Übergang von ECL 1 zur TMH2. Die Bindungsstelle überlappt nicht mit der bekannten allosterischen Bindungstasche des PAM C2 (blau). Die Positionen für CAM\* I486 im ECL 1 und I568 im ECL 2, die besonders stark von S37a inhibiert werden befinden sich in räumlicher Nähe. Das TMD-Modell wurde mit dem Fragment-basierten *Modelling*-Server GPCR-SSFE erstellt (Worth *et al.*, 2017).

Die für die Identifizierung der Bindungsstelle ausgewählten Mutationen führten nicht zu einer Erhöhung der cAMP-Basalaktivität und waren durch bTSH aktivierbar (siehe Anhang 7.4). Man kann also erwarten, dass die Konformation des TSHR bis auf die Punktmutationen erhalten blieb, sodass die fehlende Wirkung von S37a in E404A und H478A in erster Linie auf den Austausch der entsprechenden Aminosäuren zurückzuführen ist.

#### 4.2.2 Die S37a-Position im Gesamt-TSHR-Modell

Das zusammengesetzte Homologiemodell des Gesamt-TSHR in Abb. 38 enthält zusätzlich zum TMD-Modell die TSHR-Ektodomäne basierend auf der Kristallstruktur des FSH/FSHR-Komplexes (Jiang *et al.*, 2012) und präzisiert die Bindungstasche von S37a. Darin sind die beiden polaren Kontakte zu den TSHR-spezifischen Aminosäuren E404 und H478 realisiert, was die hohe Selektivität von S37a für den TSHR (Abb. 25) trotz der Nähe zu dem in GPHR konservierten internen Agonisten (Brüser *et al.*, 2016) erklärt. Der LHCGR und der FSHR weisen an den entsprechenden Stellen ein Alanin und ein Lysin auf. Die Nähe des TSHR-spezifischen E404 zu den CAM-Positionen N406, I486 und S281 könnte außerdem eine Erklärung für die relativ hohe Basalaktivität des TSHR im Vergleich zu LHCGR und FSHR, sowie für die partialagonistische Wirkung von S37a sein. Der Grund für die hohe Basalaktivität des TSHR ist nicht eindeutig geklärt und wahrscheinlich auf verschiedene Strukturen in den ICL, der TMD und der Ektodomäne zurückzuführen (Kleinau, Biebertmann, 2014).

Das Gesamt-TSHR-Modell enthält auch die EH, welche ebenfalls die Bindungstasche von S37a begrenzt. Der Phenylring 2 von S37a (Vgl. Abb. 17) hat unmittelbaren Kontakt zur EH, was erklären könnte, dass Substitutionen an diesem Phenyl die agonistische Aktivität von S37-Derivaten verstärken (Abb. 19). Vielleicht greift dieser Phenylring in das aromatische Netzwerk um S281 durch den Kontakt zu Y279 (EH) und Y481 (ECL1) ein, zusätzlich zum Kontakt zu H478, welches auch als Teil dieses Netzwerkes vermutet wird (Jaeschke *et al.*, 2006).



**Abb. 38. Das Gesamt-TSHR-Modell im inaktiven Zustand mit einer präzisierten Konformation des Übergangs von der Ektodomäne zur TMD und einer Bindungstasche für S37a.** Links: TSH (hellgrün) bindet an der LRRD (hellbraun) und Hinge-Region (blau), S37a (violett) wurde in eine allosterische Bindungsstelle zwischen Hinge-Region und TMD (grau) gedockt. **A:** Hinge-TMD-Übergang: Die extrazelluläre Helix (EH, graublau) ist über eine Disulfidbrücke mit dem internen Agonisten (grün) verbunden und interagiert auch mit dem ECL1 (cyan). Der interne Agonist befindet sich zwischen den ECL1 und 2 und den extrazellulären Bereichen von TMH1, 2 und 7. Die Aminosäuren S281 (EH), N406 (interner Agonist), I486 (ECL1), I568 (ECL2, hellbraun), V656 (ECL3, rosa), deren CAM\* besonders stark von S37a inhibiert werden, sind als Kalottenmodell dargestellt und befinden sich in räumlicher Nähe zur S37a-Docking-Position. S37a hat polare Kontakte zu E404 und H478. Die beiden entsprechenden Alanin-Mutationen können nicht von S37a inhibiert werden. **B:** Darstellung der Bindungstasche von S37a, eingebettet zwischen EH, ECL1 und internem Agonisten. Der interne Agonist interagiert wahrscheinlich über E409 und D410 mit K660 an der TMH7, wie bei Brüser et al., 2016 vorgeschlagen. Für das Gesamt-TSHR-Modell wurde das TMD-Modell (Abb. 37) sowie das zuvor generierte und publizierte Modell der Ektodomäne mit TSH verwendet (Kleinau et al., 2013), das auf den FSHR/FSH-Kristallstrukturen (PDB-Codes: 4AY9 und 4MQW; Jiang et al., 2012) basiert.

Das Vorhandensein einer möglichen Bindungsstelle in der Nähe des internen Agonisten wird dadurch gestützt, dass es möglich ist, den TSHR mit dem synthetischen Peptid FNPCEIMGY zu aktivieren, das der Sequenz des internen Agonisten entspricht (Brüser et al., 2016). Möglicherweise bindet es an derselben Stelle, wie S37a. Da dieses Peptid jedoch nur in sehr hohen Konzentrationen wirkt und keine Sättigung der  $G_s$ -Aktivierung zu erreichen ist, können keine cAMP-Messungen zur Untersuchung zur der Kompetitivität von diesem Peptid mit S37a durchgeführt werden.



### 4.3 Die intramolekulare Signalweiterleitung an der Schnittstelle von Ekto- und Transmembrandomäne

Durch die Wirkung von S37a in mutierten TSHR konnte im Zusammenhang mit der vorgeschlagenen *Docking*-Position der Substanz das Modell der Schnittstelle von Ektodomäne und TMD präzisiert werden. Insbesondere das Zusammenspiel der extrazellulären Helix der *Hinge*-Region (EH, P280 bis N288), des internen Agonisten (F405 bis Y414) und des Übergangs der TMH 2 zum ECL 1 (H478 bis I486) wird darin deutlich (Abb. 38).

Die EH ist über eine Disulfidbrücke (C283-C398) auf der einen Seite mit dem zwölften parallelen  $\beta$ -Strang verbunden, der sich an die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der LRRD anschließt. Auf der anderen Seite ist sie über das direkt benachbarte Cystein C284 durch eine Disulfidbrücke zu C408 mit dem internen Agonisten verbunden (Ho *et al.*, 2001, 2008; Brüser *et al.*, 2016). Die entscheidende Rolle der EH (auch *pivotal helix* oder *converging helix*) als Dreh- und Angelpunkt, an dem die extrazellulären TSHR-aktivierenden Signale konvergieren wurde bereits zuvor durch Mutationsdaten und Homologiemodelle bestätigt (Kleinau *et al.*, 2017; Krause *et al.*, 2012).

Die räumliche Nähe von S281 (EH) zu einem Netzwerk aromatischer Aminosäuren in ECL 1 wurde bereits aus funktionellen Untersuchungen (Jaeschke *et al.*, 2006) und zu I486 (ECL 1) aus *Crosslinking*-Studien (Schaarschmidt *et al.*, 2016) geschlossen. In unserem TSHR-Modell sind diese Strukturmerkmale realisiert (Abb. 38) und es zeigt darüber hinaus, dass S37a als NAM über dessen Phenylring 2 (Abb. 39) mit Y481 und Phenylring 1 zusätzlich mit I486 interagiert. Damit wird sowohl für das aromatische Netzwerk als auch für I486, dessen CAM I486F durch S37a stark inhibiert wird, die Bedeutung für die intramolekulare Signalweiterleitung bestätigt.

Zusätzlich zu S281Q und I486F inhibierte S37a auch die CAM N406D (interner Agonist), I568T (ECL 2) und V656F (ECL 3) stark (Abb. 15). Diese Daten unterstützen das TSHR-Modell, in dem der interne Agonist zwischen den ECL eingebettet ist und wahrscheinlich für Kooperativität aller drei ECL (Kleinau *et al.*, 2008) verantwortlich ist. Die exakte strukturelle Einbindung des ECL 3 in den Aktivierungsmechanismus ist nicht eindeutig, jedoch interagieren E409 und D410 im internen Agonisten wahrscheinlich mit K660 an der extrazellulären Seite der TMH 7, das entscheidend für die Rezeptoraktivierung ist (Claus *et al.*, 2005) und V656 im ECL 3 befindet sich in unmittelbarer Nähe dazu (Vgl. Abb. 38 A und B).

Einige Ergebnisse zum partiellen Agonismus von S37a lassen sich durch das TSHR-Modell und die *Docking*-Position nicht vollständig erklären. Beispielsweise fehlte im murinen TSHR der  $G_s$ -abhängige Partialagonismus, ähnlich wie in den trunkierten TSHR (Vgl. Abb. 31 B und Abb. 7 B), jedoch zeigt das *Alignment* der Sequenzen von humanem und murinem TSHR (siehe Anhang 7.2) in der Umgebung der identifizierten Bindungstasche von S37a keine Unterschiede. Auch für die  $G_q$ - und  $\beta$ -Arrestin-1-Signaltransduktion war S37a kein Agonist (Abb. 29 und 27). Warum der S37a-induzierte Agonismus anscheinend durch eine spezifische Interaktion der Substanz mit der humanen TSHR-Ektodomäne ausgelöst wird und nur die cAMP-Akkumulation betrifft, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und zusätzlich entscheidend für die hohe TSHR-Selektivität der Substanz sein.



Die Ergebnisse tragen auch zum Verständnis der intramolekularen Signalweiterleitung in den anderen GPHR bei, in denen der interne Agonist konserviert ist und die durch das Peptid FNPCEIDIMGY aktiviert werden können (Brüser *et al.*, 2016). Das spricht dafür, dass auch im FSHR und LHCGR eine vergleichbare Bindungstasche vorhanden ist, die jedoch durch spezifische umgebende Aminosäuren selektiv durch Liganden angegriffen werden könnte, wie die S37a-TSHR-Interaktion verdeutlicht. Allerdings sind die Auswirkungen durch die Intervention in diesem evolutionär fein abgestimmten System schwer vorherzusagen. Da die EH im Zusammenspiel mit dem internen Agonisten sowohl wie ein Agonist als auch wie ein inverser Agonist wirken kann (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2002), ist möglicherweise auch die Entwicklung reiner Agonisten und reiner Antagonisten an dieser Stelle erschwert, wie auch die SAR-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gezeigt haben.

Die Erkenntnisse zur intramolekularen Signaltransduktion im TSHR lassen sich wie folgt zusammenfassen: Durch die Bindung von TSH an die LRRD und sTyr in der *Hinge*-Region des TSHR kommt es zur Delokalisierung der EH (*Hinge*), vermittelt über die kovalente Verbindung zwischen C398 (LRRD) und C283 (EH). Da die EH gleichzeitig über C284-C408 kovalent mit dem internen Agonisten verbunden ist, wird in der Folge auch dessen Konformation beeinflusst. Die Aminosäuresequenz des internen Agonisten ist unmittelbar vor der TMH 1 lokalisiert und ist strukturell zwischen den drei extrazellulären Schleifen eingebettet. Dadurch werden die konformationellen Änderungen kooperativ auf die TMD übertragen und das Signal wird anschließend zur intrazellulären Seite des Rezeptors weitergeleitet. In der gefundenen Bindungstasche zwischen EH, ECL 1 und dem internen Agonisten interferiert der NAM S37a in diese intramolekulare Aktivierungskaskade des TSHR.

## 4.4 Struktur-Funktions-Beziehungen

### 4.4.1 S37-Enantiomere

Die Stereoisomere der im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Substanz S4 hatten eine gestreckte (S36) und eine gebogene Konformation (S37). S36 war am TSHR inaktiv (Dissertation Hoyer, 2014; Marcinkowski *et al.*, 2019). Es ist möglich, dass die gebogene Struktur von S37 eine Voraussetzung war, um in die enge Bindungstasche zwischen der EH, dem internen Agonisten und insbesondere der TMH 2 zu passen (Abb. 38 B). S37 wurde in die beiden Enantiomere getrennt, wobei nur für S37a eine Wirkung auf den TSHR bestätigt werden konnte. Durch sterische Behinderung des Phenylrings 2 (Vgl. Abb. 17) sowie der ggf. geänderten hydrophilen Interaktion mit H478 kann S37b wahrscheinlich nicht binden. Für den PAM C2, welcher in der bekannten allosterischen Bindungstasche zwischen den TMH bindet, sind ebenfalls die Enantiomere getrennt worden, wobei beide den TSHR aktivierten, jedoch mit unterschiedlicher  $EC_{50}$  (Neumann *et al.*, 2016). Das C2-Enantiomer E2 hatte eine 2,5-fach niedrigere  $EC_{50}$  für die cAMP-Akkumulation, als das Racemat C2; das Enantiomer E1 eine etwa 5-fach höhere.

Die Trennung von S37a führte zu einer Verbesserung der  $IC_{50}$  von 28 auf ca. 20  $\mu$ M, was wahrscheinlich auf die höhere Konzentration des aktiven Enantiomers zurückzuführen ist. Diese  $IC_{50}$

liegt in einem ähnlichen Bereich, wie die, anderer bekannter TSHR-Antagonisten, wie Antag3 (Neumann et al., 2014) und K14 (Latif et al., 2016). Eine nanomolare Affinität wurde mit Ausnahme des nicht-selektiven Org274179-0 (Van Koppen *et al.*, 2012) nur bei TSHR-PAM identifiziert (Übersicht: Krause, Marcinkowski, 2018).

#### 4.4.2 S37-Derivate und -Analoga

Für die SAR-Untersuchungen wurde S37 zuerst gezielt an den Phenylringen substituiert, später wurden kommerziell erhältliche S37-Analoga mit weiteren funktionellen Gruppen an der Phenylringen untersucht, und schließlich wurden in einem dritten Schritt S37-ähnliche Verbindungen synthetisiert, deren Heterozyklus verändert war. Insgesamt wurden 49 verschiedene Substanzen auf ihren antagonistischen und agonistischen Effekt auf die TSHR-G<sub>s</sub>-Aktivierung untersucht (Anhang 7.1). Dabei wurden die zwei Verbindungen S90 und S166 identifiziert, die in einer Konzentration von 50 µM einen ähnlich starken Antagonismus aufwiesen, wie S37 und S37a (Abb. 18 und 21 A). Jedoch wurde kein stärkerer TSHR-Antagonist identifiziert. Die wichtigsten Struktur-Funktionsbeziehungen sind in der Abb. 39 dargestellt.

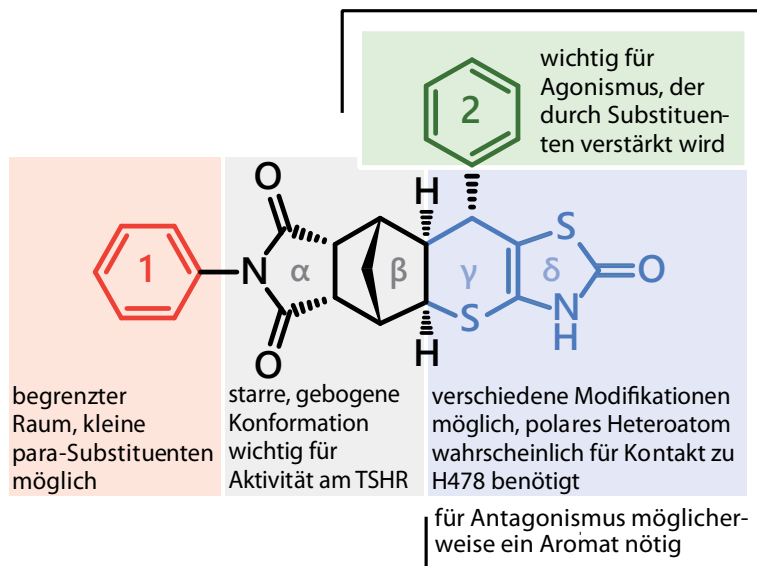
Für S90 wurde die IC<sub>50</sub> bestimmt, die mit 25 µM ähnlich der von S37a (21 µM) war. S90 besitzt mit einer zusätzlichen Methylgruppe am Phenylring 1 nur eine gering veränderte Struktur zu S37. Da S90 als Racemat vorlag, ist es möglich, dass das aktive Enantiomer eine etwas höhere Affinität, als das aktive S37-Enantiomer S37a besitzt. Andere Substitutionen am Phenyl 1 führten zu einer verringerten agonistischen Aktivität; lediglich eine Trifluormethylgruppe oder kleine Substitutionen in *para*-Stellung werden toleriert. Aus der vorgeschlagenen Bindungstasche für S37a (Abb. 38 B) geht hervor, dass bei Aufrechterhaltung des polaren Kontaktes des Pyrrolidin-Stickstoffs zum Glutamat E404 der Raum um den Phenylring 1 begrenzt ist. Substitutionen am Phenylring 2 führten meistens zu einem stärkeren Agonismus, z.B. bei S123 mit einer Methoxygruppe in *para*-Position. Im TSHR-Modell wäre dies mit einer zusätzlichen Beeinflussung von EH und internem Agonisten zu erklären, die wahrscheinlich auch ohne Substituenten, wie bei S37a selbst, für die schwache agonistische Wirkung verantwortlich ist (Abschnitt 4.2).

Die Verbindung S166 war ein ähnlich starker Antagonist, wie S37a, allerdings auch ein vergleichsweise starker Agonist (Abb. 21). Der α-, β- und γ-Ring sowie Phenyl 2 von S37 wurde erhalten. Der γ-Ring enthielt ein zusätzliches Stickstoffatom und der δ-Ring fehlte. Stattdessen enthielt die Substanz ein Methylpyridin in *para*-Stellung zum Phenyl 2. Die ansonsten identische Substanz S165 enthielt statt des Methylpyridins einen Phenylring und hatte interessanterweise kaum Wirkung am TSHR. Möglicherweise spielt die veränderte Elektronenverteilung im Aromaten bei einer π-π-Wechselwirkung des Pyridins mit dem Histidin H478 eine Rolle für die höhere Aktivität der Verbindung S166 (Liao *et al.*, 2013). Die Substanz S66 hatte trotz eines stark veränderten Indol-Heterozyklus (γ/δ-Ringe) ohne Heteroatome mit 25 % bei 50 µM einen deutlichen antagonistischen Effekt auf den TSHR. Eine Erklärung dafür wäre, dass ohne Heteroatome durch die fehlende spezifische Interaktion mit Histidin H478 zwar die Affinität verrin-

gert war, aber durch ein vergrößertes konjugiertes  $\pi$ -System (zusätzliche Doppelbindung, Strukturformel s. Tabelle 9) die Wechselwirkung mit dem aromatischen Netzwerk am ECL 1 (Jaeschke *et al.*, 2006) insgesamt verstärkt war.

Auch komplexere Modifikationen der  $\gamma/\delta$ -Ringe, wie bei der Substanz S161 werden zum Teil toleriert. Die *Docking*-Position von S37a im TSHR-Modell deutet ebenfalls an, dass die Bindungstasche in diese Richtung geöffnet ist und hier ggf. weitere Modifikationen zur Erhöhung der Affinität möglich sind. Ob ein Aromat analog zu Phenyl 2 notwendig ist, kann nicht sicher gesagt werden, weil alle untersuchten Verbindungen in diesem Bereich mindestens einen aromatischen Ring besaßen.

Insbesondere bei den kommerziell erhältlichen Verbindungen war die Stereochemie nicht klar definiert. Die für das Projekt synthetisierten Substanzen lagen in der Regel als Racemate vor. Es ist auch festzuhalten, dass die exakte Positionierung von S37a im TSHR sowie die Konformation der Bindungstasche durch das TSHR-Homologiemodell nicht mit Sicherheit vorhergesagt werden können. Zudem sind funktionelle Untersuchungen durch Mutationen in diesem für die intramolekulare Signalweiterleitung sensiblen Bereich anfällig für Artefakte durch indirekte Einflüsse auf die Proteinstruktur. Bindungsversuche mit radioaktiv markierten Substanzen würden ggf. eine unverfälschtere Einschätzung der Affinität erlauben. Die Tritium-Markierung hätte den Vorteil, die Chemie der Substanz nicht zu verändern, ist aber wahrscheinlich aufgrund der geringen spezifischen Radioaktivität für Liganden mit mikromolarer Affinität nicht geeignet (Bylund *et al.*, 2004).



**Abb. 39. Zusammenfassung der wesentlichen Struktur-Funktions-Beziehungen.** Die farbigen Strukturbestandteile von S37a wurden für SAR-Untersuchungen verändert (Details s. Abb. 17).

Ähnliche Untersuchungen wie diese für niedermolekulare TSHR-Liganden wurden für Derivate des PAM C2 beschrieben (Huang *et al.*, 2010). Verschiedene Substitutionen führten zur Generierung von anderen Agonisten, neutralen Antagonisten oder inversen Agonisten, wie Antag3 (Neumann *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Liganden der Bindungstasche in der TMD scheint es für die neu identifizierte Bindungstasche von S37a schwieriger zu sein, den Agonismus und den

Antagonismus zu trennen. Für die EO-Therapie könnte es jedoch vorteilhaft sein, den TSHR nicht komplett zu blockieren, sondern die physiologisch wichtige Basalaktivität aufrecht zu erhalten (Davies, Latif, 2015).

Die Struktur-Funktionsbeziehungen, die aus den Ergebnissen der S37-Derivate und –Analoge abgeleitet wurden, sind in Abb. 39 zusammengefasst. Während am Phenylring 1 (rot in Abb. 39) wenig Spielraum für Veränderungen besteht, deuten Substitutionen am Phenylring 2 (grün) darauf hin, dass dieser für den Partialagonismus von S37a verantwortlich ist. Polare Atome im Indol-Heterozyklus ( $\gamma/\delta$ , blau) sind wahrscheinlich für die hydrophile Interaktion mit dem TSHR verantwortlich. Mindestens ein Aromat in diesem Bereich könnte notwendig für die Interaktion mit aromatischen Aminosäuren in der *Hinge*-Region, im ECL 1 und im internen Agonisten sein. Norbornen ( $\beta$ ) und Pyrrolidindion ( $\alpha$ ) bewirken die starre, gebogene Struktur von S37a, welche wahrscheinlich für die selektive Wirkungsweise der Substanz in der Bindungstasche am TSHR entscheidend ist.

#### 4.5 Potenzial von S37a für die Entwicklung einer EO-Therapie

Aktuell ist für die EO keine zugelassene pharmakologische Therapie verfügbar, die permanenten Defekten, wie Exophthalmus und die Fibrose der Augenmuskeln verhindern oder reduzieren und die Orbitachirurgie ersetzen kann (Eckstein *et al.*, 2016). Am TSHR sind niedermolekulare Antagonisten neben blockierenden Immunglobulinen ein wichtiger Ansatz zur Intervention in die Pathogenese der EO (Davies, Latif, 2019). Andere Ansätze verfolgen die Inhibition des IGF-1-Rezeptors (IGF-1R; Smith *et al.*, 2017) sowie der Lymphozyten-Infiltration der Orbita (Plöhn *et al.*, 2018). Aufgrund des komplexen Krankheitsgeschehens in der Orbita ist möglicherweise das Eingreifen in mehr als einen dieser Prozesse notwendig für eine zufriedenstellende Therapie (Bahn, 2015). Auch für die Behandlung der Basedow-Hyperthyreose besteht Bedarf an neuen TSHR-Antagonisten, um seltene aber schwerwiegende Nebenwirkungen der Thyreostatika zu vermeiden. Nach Davies, Latif, 2015 sollte das ideale Hyperthyreose-Therapeutikum 1.) die normale Schilddrüsenfunktion erhalten, 2.) sicher sein, auch während der Schwangerschaft, 3.) auf den pathophysiologischen Mechanismus der Krankheit abzielen und 4.) nicht teurer, als aktuell verfügbare Arzneimittel sein.

S37a ist eine wertvolle Leitstruktur, da sie einige dieser Eigenschaften im Grundsatz besitzt, sodass diese bei der Weiterentwicklung eines hochaffinen TSHR-Antagonisten beibehalten werden können. S37a greift über den TSHR spezifisch in den Pathomechanismus der EO ein und besitzt durch den schwachen partiellen Agonismus das Potenzial, eine normale Schilddrüsenfunktion aufrechtzuerhalten. Erste *in-vivo*-Untersuchungen an Mäusen zeigten trotz hoher Dosierungen keine toxischen Wirkungen, reproduktionstoxikologische Untersuchungen liegen jedoch noch nicht vor. Über die Kosten einer Therapie lässt sich erst etwas sagen, wenn ein hochaffiner TSHR-Antagonist vorliegt, der für die klinische Testung infrage kommt. Die kostenintensive Trennung der Enantiomere lässt sich wahrscheinlich vermeiden, wenn das inaktive

Enantiomer keine unerwünschten Wirkungen zeigt oder ggf. optimieren, wie es für den chiralen Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Cetirizin beschrieben wurde (Švecová, Petr, 2019).

#### 4.5.1 Bestätigung der TSHR-Selektivität

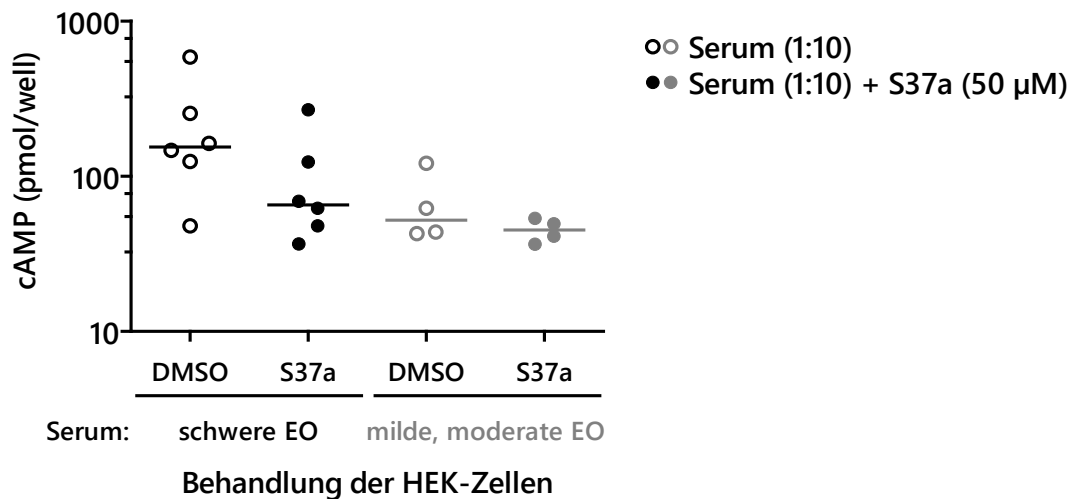
S37 war der erste beschriebene TSHR-Antagonist, der ausschließlich den TSHR und nicht die homologen Gonadotropin-Rezeptoren inhibierte (Hoyer, 2014). Diese Eigenschaft wurde in der vorliegenden Arbeit für das aktive Enantiomer S37a bestätigt (Abb. 24). Die drei untersuchten S37-Derivate mit Substitutionen an den Phenylringen S79, 90 und 125 waren genauso TSHR-selektiv. Dies unterstützt die vorgeschlagene Bindungsstelle von S37a im TSHR-Modell (Abb. 38), da die beiden polaren Kontakte zu den TSHR-spezifischen Aminosäuren E404 und H478 theoretisch auch von den Derivaten eingegangen werden können. Interessanterweise ließ sich der minimale agonistische Effekt von S37a auf den LHCGR nicht durch S90 auslösen, obwohl diese am TSHR, wie S37a, auch ein schwacher Agonist war (Abb. 25). Kreuzreaktionen mit den anderen GPHR sind auch in dieser Bindungstasche nicht vollständig auszuschließen, insbesondere weil der unmittelbar angrenzende interne Agonist in den humanen GPHR identisch ist (Brüser *et al.*, 2016).

Die Verbindung Antag3 zeigte eine Kreuzreaktion mit dem FSHR, was zuvor beschrieben wurde (Neumann *et al.*, 2014). K14 war in der vorliegenden Arbeit ein nicht-selektiver Antagonist aller drei GPHR. Dies stimmt nicht mit der Literatur überein: Bei Latif *et al.*, 2016 hatte K14 eine TSHR-Präferenz, allerdings wurde die cAMP-Akkumulation in drei verschiedenen Zelltypen gemessen (eine stabile TSHR-CHO-Zelllinie, eine stabile LHCGR-HEK-Zelllinie und eine endogen FSHR exprimierende murine Sertoli-Zelllinie).

#### 4.5.2 Proof of Principle

S37a inhibierte am TSHR neben dem Hormon bTSH und dem PAM C2 auch die G<sub>s</sub>-aktivierende Wirkung der monoklonalen stimulierenden Antikörper (TSAb) M22 (human) und KSAb1 (murin) sowie TSHR-aktivierende Patientenseren *ex vivo* in HEK-TSHR-Zellen (Abb. 22 und 23). TSAbs in Hyperthyreose-Patienten sind wahrscheinlich oligoklonal (McLachlan, Rapoport, 1996). Insofern ist es entscheidend für einen niedermolekularen Wirkstoff, allosterisch zu wirken, da ein kleines Molekül wahrscheinlich nicht in der Lage ist an verschiedenen Epitopen des Rezeptors die Bindung von TSAbs kompetitiv zu hemmen (Davies, Latif, 2015). Daher war es wichtig zu zeigen, dass S37a nicht, wie zuerst vermutet kompetitiv zu bTSH wirkt (Abb. 2), sondern bTSH nicht vom Rezeptor verdrängt (Abb. 13) und in einer allosterischen Bindungstasche in der TSHR-Transmembrandomäne (TMD) bindet (Abb. 8, 9, 11, 27, 34, 37). Auf diese Weise ist es zu erklären, dass S37a diverse TSAbs hemmen kann, was die Anwendbarkeit von S37a für die Intervention in den EO-Pathomechanismus im Grundsatz beweist (*proof of principle*). Dennoch wurden nicht alle TSHR-aktivierenden Patientenseren gleich stark inhibiert. In der Abb. 40 sind die cAMP-Werte nach TSHR-Stimulation in HEK-Zellen durch verschiedene Patientenseren aus Abb. 23 sortiert nach dem klinischen Status der Patienten (Angaben von Prof. Dr. Anja Eckstein, Universitätsklinikum Essen). Insbesondere die TSHR-Aktivierung durch Seren schwer

erkrankter Patienten wird im Mittel deutlich reduziert (schwarze Punkte), während in leichten Fällen (grau) TSHR-Aktivität (ca. 25 pmol cAMP pro Well) erhalten bleibt. Dies entspricht etwa der partialagonistischen Wirkung von S37a (Abb. 4C). Das spricht für das Potenzial von S37a bzw. S37a-Derivaten mit hoher Affinität für die Therapie schwerer EO, mit dem Vorteil, dass eine normale oder eventuell nur noch leicht erhöhte Schilddrüsenaktivität erhalten bleibt. Bei milder EO ist die Supplementation mit Selen sowie ggf. vorübergehende Therapie mit Glukokortikoiden meist ausreichend (Eckstein *et al.*, 2016).



**Abb. 40. S37a-Wirkung auf Patientenserum bei milder und schwerer EO.** Stabil transfizierte HEK-TSHR-Zellen wurden mit TSHR-aktivierenden Seren von EO-Patienten in 10-facher Verdünnung und mit S37a bzw. DMSO behandelt und die cAMP-Akkumulation mittels RIA gemessen. Die Mittelwerte der in Abb. 23 dargestellten Messungen wurden nach klinischem Status der entsprechenden Patienten gruppiert. Die Linie in der Punktwolke ist der Median der logarithmisch dargestellten Werte.

Die unterschiedlich starke TSHR-Aktivierung durch die Seren kann nicht nur durch Antikörper mit verschiedenen Paratopen und Affinitäten, sondern auch durch verschiedene Antikörpertiter ausgelöst werden (Kahaly, Diana, 2017). Dies wurde nicht näher charakterisiert.

#### 4.5.3 Bedeutung der $\beta$ -Arrestin-1-Inhibition

S37a besaß nur geringe funktionelle Selektivität (*ligand bias*), inhibierte also die drei für den TSHR beschriebenen Signalwege  $G_s$ ,  $G_q$  und  $\beta$ -Arrestin 1 mit ähnlicher Potenz ( $IC_{50}$  ca. 20  $\mu$ M für  $G_s$  und  $G_q$  sowie 4  $\mu$ M für  $\beta$ -Arrestin 1; s. Abb. 4, 29 bzw. 27).

Vor allem die  $\beta$ -Arrestin-1-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges ERK 1/2 ist wahrscheinlich involviert in der Knochenhomöostase durch die Induktion wichtiger Knochenmarkergene in Osteoblasten (Boutin *et al.*, 2014). Daher besteht die Möglichkeit, dass funktionell nicht-selektive TSHR-Antagonisten, wie S37a, welche die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung inhibieren, sich als Hyperthyreose-Arzneistoff negativ auf die Knochenhomöostase auswirken. Der leichte *Bias* von S37a für die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung könnte diese Wirkung sogar verstärken.

Bei bestehender Hyperthyreose wird durch die TSAb der Rückkopplungs-Mechanismus zur Hypophyse verstärkt, wodurch weniger TSH ausgeschüttet wird (Burch, Cooper, 2015). Es wird

angenommen, dass bei Hyperthyreose die  $\beta$ -Arrestin-1-Wirkungen von TSH in Osteoblasten fehlen, was zu verstärkter Osteoklastenaktivität und Knochenabbau bei Morbus-Basedow-Patienten führt (Abe *et al.*, 2003; Baliram *et al.*, 2011; Boutin *et al.*, 2014). Dass der TSAbs M22  $\beta$ -Arrestin-1 nur schwach aktiviert (Abb. 28), könnte stellvertretend für andere TSAbs stehen, was erklärt, warum das fehlende TSH im Knochen nicht durch TSAbs kompensiert werden kann. In diesem Fall hätte S37a bei der Behandlung einer Hyperthyreose zwar keinen positiven, aber auch keinen zusätzlichen negativen Effekt auf die Knochenhomöostase, da die Substanz die basale  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung kaum beeinflusst (Abb. 27 A).

Der kürzlich publizierte Agonist TSHR-PAM D3- $\beta$ Arr, der ausschließlich die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung, jedoch nicht die cAMP-Bildung aktiviert, könnte hingegen als Therapie einer Hyperthyreose-induzierten Osteoporose eingesetzt werden (Neumann *et al.*, 2018). Interessanter ist es jedoch, die Entwicklung eines TSHR-NAM anzustreben, der einerseits cAMP inhibiert und andererseits gleichzeitig die  $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung nicht beeinflusst oder sogar aktiviert.

#### **4.5.4 Die Anwendbarkeit von S37a *in vivo***

In der initialen Pharmakokinetik-Studie in SWISS-(CD-1)-Mäusen hatte S37a eine orale Bioverfügbarkeit von 53 % sowie eine Eliminationshalbwertszeit von etwa 3 Stunden (Abb. 32 und Anhang 0). Dies sind im Vergleich mit zugelassenen Arzneistoffen für andere GPCR, wie z.B.  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten, übliche Werte (Aktories *et al.*, 2013, S.175) und damit vielversprechend für die Anwendung von S37a *in vivo*. Nach wiederholter oraler Applikation von S37a wurden anfangs pharmakologisch wirksame Plasmakonzentrationen im zweistelligen mikromolaren Bereich erreicht, nach fünf Tagen täglicher oraler Applikation war die Plasmakonzentration jedoch deutlich reduziert (Abb. 33). Dies spricht für einen hohen *First-Pass*-Effekt (Metabolisierung der enteral resorbierten Substanz bei der ersten Passage der Leber), wie er beispielsweise auch bei den lipophileren  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Carvedilol und Propranolol beobachtet wird (Aktories *et al.*, 2013). Wahrscheinlich tritt der starke *First-Pass*-Effekt bei S37a erst nach der Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in der Leber auf (Klaassen, 2008, Kapitel 6), sodass die Plasmakonzentration erst nach wiederholter Gabe abfällt. Dies spricht für die Anwendbarkeit von S37a in kurzfristigen Hyperthyreose-Modellversuchen *in vivo* über wenige Tage, wie sie beispielsweise für den TSHR-NAM Antag3 beschrieben wurden (Neumann *et al.*, 2014). Da die Mäuse in den Modellversuchen aus London und Essen (Moshkelgosha *et al.*, 2013; Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2016) bzw. München (Ungerer *et al.*, 2017) die EO-Pathologie erst nach mehrmaliger Immunisierung über einen Zeitraum von mehreren Wochen ausbilden, ist eine kurzfristige Anwendung von S37a wahrscheinlich nicht wirkungsvoll. In diesem Zusammenhang ist auch zu bedenken, dass die  $IC_{50}$  von S37a im murinen TSHR etwas höher ist, als im humanen TSHR (Abb. 31 B).

Der Anteil von S37a, der an Plasmaproteine gebunden war, war mit 94 Prozent relativ hoch. Die Referenzsubstanz Warfarin hatte eine Plasma-Protein-Bindung von 88 Prozent. In der Literatur sind dafür 99 Prozent angegeben (Rote Liste, 2017). Die starke Plasma-Protein-Bindung

von S37a hat zwar den Nachteil, dass eine geringere Konzentration am Wirkort erreicht wird, aber den Vorteil, dass die Elimination verlangsamt ist. Allerdings können bei einem hohen *First-Pass*-Effekt auch an Plasmaproteine gebundene Wirkstoffe schnell metabolisiert werden (Aktories *et al.*, 2013, S. 45).

Da die Affinität von S37a am TSHR wahrscheinlich zu gering ist und die notwendige Dosierung zu hoch, um eine Anwendung am Menschen zu rechtfertigen, müsste, um eine nanomolare Affinität zu erreichen, die Struktur von S37a weiter optimiert werden. Dadurch würden sich wahrscheinlich auch die pharmakokinetischen Parameter verändern. Eine geringere Dosierung hätte wahrscheinlich eine schwächere Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme und somit möglicherweise einen schwächeren *First-Pass*-Effekt zur Folge. Die Reduktion des *First-Pass*-Effekts um nur 10 % von 90 auf 80 % führt zu einer Verdopplung der Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes von 10 auf 20 % (Aktories *et al.*, 2013, S. 65). Alternativ könnte das S37a-Metabolitenspektrum untersucht werden, um kausale Molekülmodifikationen abzuleiten, welche die Metabolisierung beispielsweise durch Cytochrom-P-450-Monooxygenasen (CYP450) herabsetzen.

Die Pharmakokinetik eines potenziellen hochaffinen S37a-Derivats lässt sich schwer vorher-sagen und müsste erneut untersucht werden. Vor einer Zulassung für die klinische Prüfung an Menschen sind weitere präklinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik vorgeschrieben, die insbesondere auch Spezies-Unterschiede berücksichtigen (Europäische Arzneimittel-Agentur, 2009).

Bisherige Toxizitäts-Tests in HEK-Zellen des Racemats S37 (Hoyer, 2014) sowie die wiederholte Applikation von S37a an Mäusen (Abb. 33) haben keine Hinweise auf toxische Wirkungen gezeigt, sodass eine Weiterentwicklung der Leitverbindung vielversprechend ist.

## 4.6 Fazit

Aktuell befinden sich verschiedene kausale Therapieansätze für die EO in der Entwicklung. Der IGF-1-Rezeptor-blockierende Antikörper Teprotumumab zeigte in einer Phase-2-Studie bereits deutliche Wirkung, insbesondere bei der Reduktion des Exophthalmus, führte jedoch nicht bei allen Patienten zu einer vollständigen Remission (Smith *et al.*, 2017). Der TSHR-blockierende Antikörper K1-70 bewirkte bei einer Schilddrüsenkarzinom-Patientin eine Verbesserung der assoziierten Orbitopathie und befindet sich momentan in einer Phase-1-Studie (Furmaniak *et al.*, 2018). Speziell die Augenmuskelfibrose entsteht bei der EO relativ schnell und ist irreversibel und ist zudem hauptsächlich TSHR-abhängig (Zhang *et al.*, 2014), sodass nicht geklärt ist, ob die Intervention in die Signaltransduktion einer der beiden Rezeptoren ausreichend ist, oder ob ggf. eine Kombinationstherapie notwendig ist.

Weitere Therapie-Ansätze sind von der TSHR-LRRD abgeleitete Peptide zur Induktion von Toleranz des Immunsystems gegenüber TSHR (Faßbender *et al.*, 2019) sowie die Inhibition des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors zur Reduktion der Lymphozyten-Infiltration in die Orbita (Plöhn, 2019).

Die Verwendung von funktionalen Antikörpern als Biopharmazeutika zur Behandlung der EO hat den Vorteil einer sehr hohen Spezifität für das Zielprotein, ihre Entwicklung für eine



relativ seltene Krankheit, wie der EO wurde jedoch bisher als zu kostspielig angesehen (Davies, Latif, 2015). Die Möglichkeit seltener, aber schwerer Reaktionen, wie Anaphylaxie im Laufe der klinischen Prüfung (Reynolds *et al.*, 2013), spricht zusätzlich dafür, parallel die Entwicklung niedermolekularer (*small molecule*) negativ allosterischer Modulatoren (NAM) zu betreiben. Die relativ einfache Herstellung, die Möglichkeit für chemische Modifikationen sowie ggf. der Vorteil oraler Applikation sind weitere Argumente für deren Entwicklung (Davies, Latif, 2015).

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigen sich zurzeit mit der Entwicklung von NAM für den TSHR, darunter die Gruppe von Marvin C. Gershengorn und Susanne Neumann an den National Institutes of Health (Bethesda, USA) und die Gruppe von Terry F. Davies und Rauf Latif an der Icahn School of Medicine at Mount Sinai (New York, USA). In verschiedenen Hochdurchsatz-Screenings wurden die Verbindungen Antag3 (Neumann *et al.*, 2014), K14 (Latif *et al.*, 2016) sowie in unserer Arbeitsgruppe die Substanz S37 (Hoyer, 2014) identifiziert. Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte aktive Enantiomer S37a ist ebenfalls ein mikromolarer TSHR-NAM mit dem Potenzial, zu einem hochaffinen nanomolaren NAM weiterentwickelt zu werden. Mit S37 und S37a wurden vier wichtige Etappenziele erreicht: 1.) einen hochselektiven Antagonisten zu identifizieren, der die homologen Gonadotropin-Rezeptoren nicht inhibiert 2.) der in *ex-vivo*-Versuchen die erhöhte TSHR-Aktivierung durch Seren von EO-Patienten reduziert, 3.) der in ersten *in-vivo*-Untersuchungen zur Pharmakokinetik in Mäusen zumindest kurzfristig eine geeignete orale Bioverfügbarkeit gezeigt hat und nicht toxisch war. 4.) Die für S37a vorgeschlagene Bindungsstelle am TSHR, die im Gegensatz zu Antag3 oder K14 an der Grenzfläche zwischen Transmembran- und Ektodomäne liegt, eröffnet die Möglichkeit, im Zusammenhang mit den Erkenntnissen aus den Struktur-Funktions-Beziehungen der S37-Analoga, durch rationales Wirkstoffdesign weitere hochaffine, TSHR-selektive Verbindungen zu synthetisieren, die für die klinische Prüfung geeignet sind.

## 5 Literatur

- Abe, E.; Mariani, R.C.; Yu, W.; Wu, X. Bin; Ando, T.; Li, Y.; Iqbal, J.; Eldeiry, L.; Rajendren, G.; Blair, H.C.; Davies, T.F.; Zaidi, M. (2003). TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell* **115** (2): 151–62
- Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K. (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. (Urban & Fischer (Elsevier), 2013).
- Allen, M.D.; Neumann, S.; Gershengorn, M.C. (2011). Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling. *FASEB J.* **25** (10): 3687–3694
- Anelli, T.; Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* **27** (2): 315–27
- Antonelli, A.; Ferrari, S.M.; Corrado, A.; Di Domenicantonio, A.; Fallahi, P. (2015). Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun. Rev.* **14** (2): 174–80
- Arunlakshana, O.; Schild, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **14** (1): 48–58
- Avelar-Freitas, B.A.; Almeida, V.G.; Pinto, M.C.X.; Mourão, F.A.G.; Massensini, A.R.; Martins-Filho, O.A.; Rocha-Vieira, E.; Brito-Melo, G.E.A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **47** (4): 307–315
- Bahn, R.S.; Dutton, C.M.; Natt, N.; Joba, W.; Spitzweg, C.; Heufelder, A.E. (1998). Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83** (3): 998–1002
- Bahn, R.S. (2015). Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. *Horm. Metab. Res.* **47** (10): 773–8
- Bahn, R.S. (2010). Graves' Ophthalmopathy. *N Engl J Med* **362** (8): 726–738
- Bahn, R.S. (2013). News and Views: At Long Last, an Animal Model of Graves' Orbitopathy. *Endocrinology* **154** (9): 2989–2991
- Baliram, R.; Latif, R.; Berkowitz, J.; Frid, S.; Colaianni, G.; Sun, L.; Zaidi, M.; Davies, T.F. (2011). Thyroid-stimulating hormone induces a Wnt-dependent, feed-forward loop for osteoblastogenesis in embryonic stem cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (39): 16277–82
- Banga, J.P.; Moshkelgosha, S.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Eckstein, A. (2015). Modeling Graves' Orbitopathy in Experimental Graves' Disease. *Horm. Metab. Res.* **47** (10): 797–803
- Bartalena, L. (2011). The dilemma of how to manage Graves' hyperthyroidism in patients with associated orbitopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96** (3): 592–9
- Berchner-Pfannschmidt, U.; Moshkelgosha, S.; Diaz-Cano, S.; Edelmann, B.; Görtz, G.E.; Horstmann, M.; Noble, A.; Hansen, W.; Eckstein, A.; Banga, J.P. (2016). Comparative assessment of female mouse model of Graves' orbitopathy under different environments, accompanied by proinflammatory cytokine and T-cell responses to thyrotropin hormone receptor antigen. *Endocrinology* **157** (4): 1673–1682
- Berman, H.M.; Battistuz, T.; Bhat, T.N.; Bluhm, W.F.; Bourne, P.E.; Burkhardt, K.; Feng, Z.; Gilliland, G.L.; Iype, L.; Jain, S.; Fagan, P.; Marvin, J.; Padilla, D.; Ravichandran, V.; Schneider, B.; Thanki, N.; Weissig, H.; Westbrook, J.D.; Zardecki, C. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58** (Pt 6 No 1): 899–907
- Beyermann, M.; Fechner, K.; Furkert, J.; Krause, E.; Bienert, M. (1996). A single-point slight alteration set as a tool for structure-activity relationship studies of ovine corticotropin releasing factor. *J. Med. Chem.* **39** (17): 3324–30

- Bourquard, T.; Landomiel, F.; Reiter, E.; Crépieux, P.; Ritchie, D.W.; Azé, J.; Poupon, A. (2015).** Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/ $\beta$ -arrestin/Erk module complex. *Sci. Rep.* **5** (January): 10760
- Boutin, A.; Eliseeva, E.; Gershengorn, M.C.; Neumann, S. (2014).**  $\beta$ -Arrestin-1 mediates thyrotropin-enhanced osteoblast differentiation. *FASEB J.* **28** (8): 3446–3455
- Brüser, A.; Schulz, A.; Rothmund, S.; Ricken, A.; Calebiro, D.; Kleinau, G.; Schöneberg, T. (2016).** The activation mechanism of glycoprotein hormone receptors with implications in the cause and therapy of endocrine diseases. *J. Biol. Chem.* **291** (2): 508–520
- Burch, H.B.; Cooper, D.S. (2015).** Management of Graves Disease: A Review. *JAMA* **314** (23): 2544–54
- Bylund, D.B.; Deupree, J.D.; Toews, M.L. (2004).** Radioligand-binding methods for membrane preparations and intact cells. *Methods Mol. Biol.* **259** 1–28
- Cawood, T.; Moriarty, P.; O'Shea, D. (2004).** Recent developments in thyroid eye disease. *BMJ* **329** (7462): 385–90
- Chazenbalk, G.D.; Pichurin, P.; Chen, C.R.; Latrofa, F.; Johnstone, A.P.; McLachlan, S.M.; Rapoport, B. (2002).** Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J. Clin. Invest.* **110** (2): 209–217
- Cheng, Y.; Prusoff, W.H. (1973).** Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22** (23): 3099–108
- Christopoulos, A.; Kenakin, T. (2002).** G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* **54** (2): 323–74
- Claus, M.; Jaeschke, H.; Kleinau, G.; Neumann, S.; Krause, G.; Paschke, R. (2005).** A hydrophobic cluster in the center of the third extracellular loop is important for thyrotropin receptor signaling. *Endocrinology* **146** (12): 5197–5203
- ClinicalTrials.gov.** Treatment of Graves' Orbitopathy (Thyroid Eye Disease) to Reduce Proptosis With Teprotumumab Infusions in a Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Study (OPTIC). *NCT03298867*, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), abgerufen am 19.05.2019
- ClinicalTrials.gov.** K1-70 - A Study in Subjects With Graves' Disease. *NCT02904330*, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), abgerufen am 19.05.2019
- Costagliola, S.; Panneels, V. (2002).** Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J.* **21** (4): 504–513
- Couët, J.; De Bernard, S.; Loosfelt, H.; Saunier, B.; Milgrom, E.; Misrahi, M. (1996).** Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *Biochemistry* **35** (47): 14800–14805
- Curro, N.; Covelli, D.; Vannucchi, G.; Campi, I.; Pirola, G.; Simonetta, S.; Dazzi, D.; Guastella, C.; Pignataro, L.; Beck-Peccoz, P.; Ratiglia, R.; Salvi, M. (2014).** Therapeutic outcomes of high-dose intravenous steroids in the treatment of dysthyroid optic neuropathy. *Thyroid* **24** (5): 897–905
- Davies, T.F.; Latif, R. (2015).** Targeting the thyroid-stimulating hormone receptor with small molecule ligands and antibodies. *Expert Opin. Ther. Targets* **19** (6): 835–47
- Davies, T.F.; Latif, R. (2019).** Editorial: TSH Receptor and Autoimmunity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10** 19
- Deupi, X.; Edwards, P.; Singhal, A.; Nickle, B.; Oprian, D.; Schertler, G.; Standfuss, J. (2012).** Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (1): 119–124

- Douglas, R.S. (2019).** Teprotumumab, an insulin-like growth factor-1 receptor antagonist antibody, in the treatment of active thyroid eye disease: a focus on proptosis. *Eye (Lond)*. **33** (2): 183–190
- Eckstein, A.; Dekowski, D.; Führer-Sakel, D.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Esser, J. (2016).** Endokrine Orbitopathie. *Der Ophthalmol.* **113** (4): 349–366
- Ehlert, F.J. (1988).** Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol. Pharmacol.* **33** (2): 187–94
- El-Kaissi, S.; Wall, J.R. (2012).** Targeting the thyrotropin receptor in thyroid disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **16** (7): 719–727
- Van Den Ent, F.; Löwe, J. (2006).** RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **67** (1): 67–74
- Europäische Arzneimittel-Agentur (2009).** ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), abgerufen am 18.05.2019
- Faßbender, J.; Holthoff, H.-P.; Li, Z.; Ungerer, M. (2019).** Therapeutic Effects of Short Cyclic and Combined Epitope Peptides in a Long-Term Model of Graves' Disease and Orbitopathy. *Thyroid* **29** (2): 258–267
- Feldon, S.E.; Park, D.J.J.; O'Loughlin, C.W.; Nguyen, V.T.; Landskroner-Eiger, S.; Chang, D.; Thatcher, T.H.; Phipps, R.P. (2005).** Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46** (11): 3913–21
- Fredriksson, R. (2003).** The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63** (6): 1256–1272
- Fredriksson, R.; Schiöth, H.B. (2005).** The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67** (5): 1414–25
- Frenzel, R.; Voigt, C.; Paschke, R. (2006).** The Human Thyrotropin Receptor Is Predominantly Internalized by  $\beta$ -Arrestin 2. *Endocrinology* **147** (6): 3114–3122
- Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H. et al. (2016).** Gaussian 09, revision A.02.
- Furmaniak, J.; Sanders, J.; Núñez Miguel, R.; Rees Smith, B. (2015).** Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies. *Horm. Metab. Res.* **47** (10): 735–752
- Furmaniak, J.; Ryder, M.M.; Castro, M.R.; Wentworth, M.; Algeciras, A.; Morris, J.C.; Garrity, J.; Wilmot, J.; Kabelis, K.; Sanders, J.; Rees Smith, B. (2018).** Blocking the TSH Receptor with the Human Monoclonal Autoantibody K1-70 (TM) Improves Graves' Ophthalmopathy and Aids Control of Advanced Follicular Thyroid Carcinoma - Results of Long-Term Treatment Under the First in Human Single Patient Expanded Use The. *Eur. Thyroid J. - 41st Annu. Meet. Eur. Thyroid Assoc.* **7** (Suppl. 1): 22
- Gilbert, J.A.; Gianoukakis, A.G.; Salehi, S.; Moorhead, J.; Rao, P. V; Khan, M.Z.; McGregor, A.M.; Smith, T.J.; Banga, J.P. (2006).** Monoclonal pathogenic antibodies to the thyroid-stimulating hormone receptor in Graves' disease with potent thyroid-stimulating activity but differential blocking activity activate multiple signaling pathways. *J. Immunol.* **176** (8): 5084–92
- Goodman, O.B.; Krupnick, J.G.; Santini, F.; Gurevich, V. V; Penn, R.B.; Gagnon, A.W.; Keen, J.H.; Benovic, J.L. (1996).** Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383** (6599): 447–50
- Grasberger, H.; Van Sande, J.; Mahameed, A.H.D.; Tenenbaum-Rakover, Y.; Refetoff, S. (2007).** Brief report: A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca<sup>2+</sup>-cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92** (7): 2816–2820

- Haas, A.-K.K.; Kleinau, G.; Hoyer, I.; Neumann, S.; Furkert, J.; Rutz, C.; Schülein, R.; Gershengorn, M.C.; Krause, G. (2011). Mutations that silence constitutive signaling activity in the allosteric ligand-binding site of the thyrotropin receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* **68** (1): 159–167
- Ho, S.C.; Van Sande, J.; Lefort, A.; Vassart, G.; Costagliola, S. (2001). Effects of mutations involving the highly conserved S281HCC motif in the extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor on TSH binding and constitutive activity. *Endocrinology* **142** (7): 2760–2767
- Ho, S.N.; Hunt, H.D.; Horton, R.M.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77** (1): 51–59
- Ho, S.C.; Goh, S.S.; Li, S.; Khoo, D.H.; Paterson, M. (2008). Effects of Mutations Involving Cysteine Residues Distal to the S281HCC Motif at the C-Terminus on the Functional Characteristics of a Truncated Ectodomain-Only Thyrotropin Receptor Anchored on Glycosylphosphatidyl-Inositol. *Thyroid* **18** (12): 1313–1319
- Holthoff, H.-P.; Goebel, S.; Li, Z.; Faßbender, J.; Reimann, A.; Zeibig, S.; Lohse, M.J.; Münch, G.; Ungerer, M. (2015). Prolonged TSH receptor A subunit immunization of female mice leads to a long-term model of Graves' disease, tachycardia, and cardiac hypertrophy. *Endocrinology* **156** (4): 1577–89
- Holthoff, H.-P.; Li, Z.; Faßbender, J.; Reimann, A.; Adler, K.; Münch, G.; Ungerer, M. (2017). Cyclic Peptides for Effective Treatment in a Long-Term Model of Graves Disease and Orbitopathy in Female Mice. *Endocrinology* **158** (7): 2376–2390
- Hoyer, I. (2014). Struktur-Funktionsanalysen intramolekularer Signalisierungsmechanismen und pharmakologische Intervention am Thyreoidea-stimulierenden Hormon Rezeptor. *Diss. Freie Univ. Berlin*
- Hoyer, I.; Haas, A.-K.; Kreuchwig, A.; Schülein, R.; Krause, G. (2013). Molecular sampling of the allosteric binding pocket of the TSH receptor provides discriminative pharmacophores for antagonist and agonists. *Biochem. Soc. Trans.* **41** (1): 213–217
- Huang, W.; Englund, E.; Titus, S.; Southall, N.; Zheng, W.; Ferrer, M.; Marugan, J.; Neumann, S.; Gershengorn, M. (2010). Identification of Thyroid Stimulating Hormone Receptor Inverse Agonists. *Probe Reports from NIH Mol. Libr. Progr.* (2010).
- Jaeschke, H.; Neumann, S.; Kleinau, G.; Mueller, S.; Claus, M.; Krause, G.; Paschke, R. (2006). An aromatic environment in the vicinity of serine 281 is a structural requirement for thyrotropin receptor function. *Endocrinology* **147** (4): 1753–1760
- Jäschke, H.; Neumann, S.; Moore, S.; Thomas, C.J.; Colson, A.O.; Costanzi, S.; Kleinau, G.; Jiang, J.K.; Paschke, R.; Raaka, B.M.; Krause, G.; Gershengorn, M.C. (2006). A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). *J. Biol. Chem.* **281** (15): 9841–9844
- Jiang, X.; Fischer, D.; Chen, X.; McKenna, S.D.; Liu, H.; Sriraman, V.; Yu, H.N.; Goutopoulos, A.; Arkinstall, S.; He, X. (2014). Evidence for follicle-stimulating hormone receptor as a functional trimer. *J. Biol. Chem.* **289** (20): 14273–14282
- Jiang, X.; Liu, H.; Chen, X.; Chen, P.-H.; Fischer, D.; Sriraman, V.; Yu, H.N.; Arkinstall, S.; He, X. (2012). Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (31): 12491–12496
- Jin, S.; Hornicek, F.J.; Neylan, D.; Zakarija, M.; McKenzie, J.M. (1986). Evidence that adenosine 3',5'-monophosphate mediates stimulation of thyroid growth in FRTL5 cells. *Endocrinology* **119** (2): 802–10
- Kahaly, G.J.; Diana, T. (2017). TSH receptor antibody functionality and nomenclature. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8** (FEB): 28

- Kang, Y.; Zhou, X.E.; Gao, X.; He, Y.; Liu, W.; Ishchenko, A.; Barty, A.; White, T.A.; Yefanov, O.; Han, G.W. et al. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* 523 (7562): 561–7
- Kero, J.; Ahmed, K.; Wettschureck, N.; Tunaru, S.; Wintermantel, T.; Greiner, E.; Schütz, G.; Offermanns, S. (2007). Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J. Clin. Invest.* 117 (9): 2399–407
- Klaassen, C.D. (2008). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. (McGraw Hill Medical, 2008).
- Kleinau, G.; Haas, A.-K.; Neumann, S.; Worth, C.L.; Hoyer, I.; Furkert, J.; Rutz, C.; Gershengorn, M.C.; Schulein, R.; Krause, G. (2010). Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor. *FASEB J.* 24 (7): 2347–2354
- Kleinau, G.; Biebermann, H. (2014). Constitutive activities in the thyrotropin receptor: regulation and significance. *Adv. Pharmacol.* 70 81–119
- Kleinau, G.; Hoyer, I.; Kreuchwig, A.; Haas, A.K.; Rutz, C.; Furkert, J.; Worth, C.L.; Krause, G.; Schulein, R. (2011). From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family A G-protein-coupled receptors (GPCRs). *J. Biol. Chem.* 286 (29): 25859–25871
- Kleinau, G.; Jaeschke, H.; Mueller, S.; Raaka, B.M.; Neumann, S.; Paschke, R.; Krause, G. (2008). Evidence for cooperative signal triggering at the extracellular loops of the TSH receptor. *FASEB J.* 22 (8): 2798–808
- Kleinau, G.; Jäschke, H.; Neumann, S.; Lättig, J.; Paschke, R.; Krause, G.; Jätschke, H.; Neumann, S.; Lättig, J.; Paschke, R.; Krause, G.; Jäschke, H.; Neumann, S.; Lättig, J.; Paschke, R.; Krause, G. (2004). Identification of a Novel Epitope in the Thyroid-stimulating Hormone Receptor Ectodomain Acting as Intramolecular Signaling Interface. *J. Biol. Chem.* 279 (49): 51590–51600
- Kleinau, G.; Krause, G. (2009). Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr. Rev.* 30 (2): 133–151
- Kleinau, G.; Mueller, S.; Jaeschke, H.; Grzesik, P.; Neumann, S.; Diehl, A.; Paschke, R.; Krause, G. (2011). Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *J. Biol. Chem.* 286 (25): 22622–22631
- Kleinau, G.; Neumann, S.; Grüters, A.; Krude, H.; Biebermann, H. (2013). Novel insights on thyroid-stimulating hormone receptor signal transduction. *Endocr. Rev.* 34 (5): 691–724
- Kleinau, G.; Worth, C.L.; Kreuchwig, A.; Biebermann, H.; Marcinkowski, P.; Scheerer, P.; Krause, G. (2017). Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8 (APR): 86
- Kopp, P. (2001). Human Genome and Diseases: Review The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (9): 1301–1322
- Van Koppen, C.J.; De Gooyer, M.E.; Karstens, W.J.; Plate, R.; Conti, P.G.M.; Van Achterberg, T.A.E.; Van Amstel, M.G.A.; Brands, J.H.G.M.; Wat, J.; Berg, R.J.W.; Lane, J.R.D.; Miltenburg, A.M.M.; Timmers, C.M. (2012). Mechanism of action of a nanomolar potent, allosteric antagonist of the thyroid-stimulating hormone receptor. *Br. J. Pharmacol.* 165 (7): 2314–2324
- Kotwal, A.; Stan, M. (2018). Current and Future Treatments for Graves' Disease and Graves' Ophthalmopathy. *Horm. Metab. Res.* 50 (12): 871–886
- Krause, G.; Hoyer, I.; Specker, E.; Furkert, J.; Marcinkowski, P.; von Kries, J.; Neuenschwander, M.; Nazare M (2017). Antagonists of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor (TSHR). *Patentanmeldung WIPO Publ. Number WO 2017/186793 A1*

- Krause, G.; Kreuchwig, A.; Kleinau, G. (2012).** Extended and Structurally Supported Insights into Extracellular Hormone Binding, Signal Transduction and Organization of the Thyrotropin Receptor. *PLoS One* 7 (12): e52920
- Krause, G.; Marcinkowski, P. (2018).** Correction: Intervention Strategies into Glycoprotein Hormone Receptors for Modulating (Mal-)function, with Special Emphasis on the TSH Receptor. *Horm. Metab. Res.* 50 (12): e8
- Kreuchwig, A.; Kleinau, G.; Krause, G. (2013).** Research Resource: Novel Structural Insights Bridge Gaps in Glycoprotein Hormone Receptor Analyses. *Mol. Endocrinol.* 27 (8): 1357–1363
- Krieger, C.C.; Neumann, S.; Marcus-Samuels, B.; Gershengorn, M.C. (2017).** TSHR/IGF-1R Cross-Talk, Not IGF-1R Stimulating Antibodies, Mediates Graves' Ophthalmopathy Pathogenesis. *Thyroid* 27 (5): 746–747
- Krieger, C.C.; Neumann, S.; Place, R.F.; Marcus-Samuels, B.; Gershengorn, M.C. (2015).** Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobulins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (3): 1071–1077
- Krieger, C.C.; Place, R.F.; Bevilacqua, C.; Marcus-Samuels, B.; Abel, B.S.; Skarulis, M.C.; Kahaly, G.J.; Neumann, S.; Gershengorn, M.C. (2016).** TSH/IGF-1 receptor cross talk in graves' ophthalmopathy pathogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101 (6): 2340–2347
- Krieger, C.C.; Perry, J.D.; Morgan, S.J.; Kahaly, G.J.; Gershengorn, M.C. (2017).** TSH/IGF-1 Receptor Cross-Talk Rapidly Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases in Multiple Cell Types. *Endocrinology* 158 (10): 3676–3683
- Kumar, S.; Bahn, R.S. (2003).** Relative overexpression of macrophage-derived cytokines in orbital adipose tissue from patients with Graves' ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (9): 4246–4250
- Larsen, P.R. (1982).** Thyroid-pituitary interaction: feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones. *N. Engl. J. Med.* 306 (1): 23–32
- Latif, R.; Ali, M.R.; Ma, R.; David, M.; Morshed, S.A.; Ohlmeyer, M.; Felsenfeld, D.P.; Lau, Z.; Mezei, M.; Davies, T.F. (2015).** New Small Molecule Agonists to the Thyrotropin Receptor. *Thyroid* 25 (1): 51–62
- Latif, R.; Realubit, R.B.; Karan, C.; Mezei, M.; Davies, T.F. (2016).** TSH Receptor Signaling Abrogation by a Novel Small Molecule. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7 (SEP): 130
- Laugwitz, K.L.; Allgeier, A.; Offermanns, S.; Spicher, K.; Van Sande, J.; Dumont, J.E.; Schultz, G. (1996).** The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1): 116–20
- Laurent, E.; Mockel, J.; Van Sande, J.; Graff, I.; Dumont, J.E. (1987).** Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol. Cell. Endocrinol.* 52 (3): 273–8
- Liao, S.-M.; Du, Q.-S.; Meng, J.-Z.; Pang, Z.-W.; Huang, R.-B. (2013).** The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chem. Cent. J.* 7 (1): 44
- Manglik, A.; Kruse, A.C. (2017).** Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry* 56 (42): 5628–5634
- Marcinkowski, P. (2015).** Thyreotropin-Rezeptor-Konstrukte zur Charakterisierung von Liganden. *Masterarbeit Charité-Universitätsmedizin Berlin*
- Marcinkowski, P.; Hoyer, I.; Specker, E.; Furkert, J.; Rutz, C.; Neuenschwander, M.; Sobottka, S.; Sun, H.; Nazare, M.; Berchner-Pfannschmidt, U.; von Kries, J.P.; Eckstein, A.; Schüle, R.; Krause, G. (2019).** A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 29 (1): 111–123

- Marcocci, C.; Kahaly, G.J.; Krassas, G.E.; Bartalena, L.; Prummel, M.; Stahl, M.; Altea, M.A.; Nardi, M.; Pitz, S.; Boboridis, K.; Sivelli, P.; von Arx, G.; Mourits, M.P.; Baldeschi, L.; Bencivelli, W.; Wiersinga, W.; European Group on Graves' Orbitopathy (2011). Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N. Engl. J. Med.* **364** (20): 1920–31
- McLachlan, S.M.; Rapoport, B. (1996). Monoclonal, human autoantibodies to the TSH receptor - The holy grail and why are we looking for it? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81** (9): 3152–3154
- Mendieta, S. (2019). Thyreotropin-Rezeptor-Varianten zur Charakterisierung von niedermolekularen Liganden.
- Miller-Gallacher, J.; Sanders, P.; Young, S.; Sullivan, A.; Baker, S.; Reddington, S.C.; Clue, M.; Kabelis, K.; Clark, J.; Wilmot, J.; Thomas, D.; Chlebowska, M.; Cole, F.; Pearson, E.; Roberts, E.; Holly, M.; Evans, M.; Núñez Miguel, R.; Powell, M.; Sanders, J.; Furmaniak, J.; Rees Smith, B. (2019). Crystal structure of a ligand-free stable TSH receptor leucine-rich repeat domain. *J. Mol. Endocrinol.* **62** (3): 117–128
- Misrahi, M.; Milgrom, E. (1997). Cleavage and shedding of the TSH receptor. *Eur. J. Endocrinol.* **137** (6): 599–602
- Moore, S.; Jaeschke, H.; Kleinau, G.; Neumann, S.; Costanzi, S.; Jiang, J.K.; Childress, J.; Raaka, B.M.; Colson, A.; Paschke, R.; Krause, G.; Thomas, C.J.; Gershengorn, M.C. (2006). Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: Structure-activity relationships and selective binding patterns. *J. Med. Chem.* **49** (13): 3888–3896
- Moshkelgosha, S.; So, P.-W.W.; Deasy, N.; Diaz-Cano, S.; Banga, J.P. (2013). Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology* **154** (9): 3008–15
- Mueller, S.; Gozu, H.I.; Bircan, R.; Jaeschke, H.; Eszlinger, M.; Lueblinghoff, J.; Krohn, K.; Paschke, R. (2009). Cases of borderline in vitro constitutive thyrotropin receptor activity: how to decide whether a thyrotropin receptor mutation is constitutively active or not? *Thyroid* **19** (7): 765–73
- Nakamura, H.; Miyauchi, A.; Miyawaki, N.; Imagawa, J. (2013). Analysis of 754 cases of antithyroid drug-induced agranulocytosis over 30 years in Japan. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98** (12): 4776–83
- Neumann, S.; Eliseeva, E.; Boutin, A.; Barnaeva, E.; Ferrer, M.; Southall, N.; Kim, D.; Hu, X.; Morgan, S.J.; Marugan, J.J.; Gershengorn, M.C. (2018). Discovery of a Positive Allosteric Modulator of the Thyrotropin Receptor: Potentiation of Thyrotropin-Mediated Preosteoblast Differentiation In Vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **364** (1): 38–45
- Neumann, S.; Huang, W.; Titus, S.; Krause, G.; Kleinau, G.; Alberobello, A.T.; Zheng, W.; Southall, N.T.; Inglese, J.; Austin, C.P.; Celi, F.S.; Gavrilo, O.; Thomas, C.J.; Raaka, B.M.; Gershengorn, M.C. (2009). Small-molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (30): 12471–6
- Neumann, S.; Kleinau, G.; Costanzi, S.; Moore, S.; Jiang, J.; Raaka, B.M.; Thomas, C.J.; Krause, G.; Gershengorn, M.C. (2008). A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism. *Endocrinology* **149** (12): 5945–50
- Neumann, S.; Nir, E.A.; Eliseeva, E.; Huang, W.; Marugan, J.; Xiao, J.; Dulcey, A.E.; Gershengorn, M.C. (2014). A Selective TSH Receptor Antagonist Inhibits Stimulation of Thyroid Function in Female Mice. *Endocrinology* **155** (1): 310–314
- Neumann, S.; Padia, U.; Cullen, M.J.; Eliseeva, E.; Nir, E.A.; Place, R.F.; Morgan, S.J.; Gershengorn, M.C. (2016). An enantiomer of an oral small-molecule TSH receptor agonist exhibits improved pharmacologic properties. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7** (JUL): 4–11



- Oakley, R.H.; Laporte, S.A.; Holt, J.A.; Caron, M.G.; Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$ arrestin1, and  $\beta$ arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275** (22): 17201–17210
- OpenWetWare (2018). Round-the-horn site-directed mutagenesis. *OpenWetWare*, [https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=%27Round-the-horn\\_site-directed\\_mutagenesis&oldid=1055958](https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=%27Round-the-horn_site-directed_mutagenesis&oldid=1055958). abgerufen am 24.05.2019
- Plöhn, S. (2019). The crucial role of sphingosine-1-phosphate and the therapeutic potential of fingolimod for Graves' disease and associated orbitopathy. *Diss. Univ. Duisburg-Essen*
- Plöhn, S.; Edelmann, B.; Japtok, L.; He, X.; Hose, M.; Hansen, W.; Schuchman, E.H.; Eckstein, A.; Berchner-Pfannschmidt, U. (2018). CD40 Enhances Sphingolipids in Orbital Fibroblasts: Potential Role of Sphingosine-1-Phosphate in Inflammatory T-Cell Migration in Graves' Orbitopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59** (13): 5391–5397
- Pyne, N.J.; Pyne, S. (2011). Receptor tyrosine kinase-G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow? *Trends Pharmacol. Sci.* **32** (8): 443–50
- Rapoport, B.; Aliesky, H.A.; Chen, C.R.; McLachlan, S.M. (2015). Evidence that TSH receptor A-subunit multimers, not monomers, drive antibody affinity maturation in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100** (6): E871–E875
- Rapoport, B.; McLachlan, S.M. (2016). TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. *Endocr. Rev.* **37** (2): 114–134
- Rapoport, B.; McLachlan, S.M. (2007). The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid* **17** (10): 911–922
- Rapoport, B.; McLachlan, S.M. (2018). Reflections on Thyroid Autoimmunity: A Personal Overview from the Past into the Future. *Horm. Metab. Res.* **50** (12): 840–852
- Rasmussen, S.G.F.; Choi, H.-J.; Rosenbaum, D.M.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Edwards, P.C.; Burghammer, M.; Ratnala, V.R.P.; Sanishvili, R.; Fischetti, R.F.; Schertler, G.F.X.; Weis, W.I.; Kobilka, B.K. (2007). Crystal structure of the human  $\beta$ 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450** (7168): 383–387
- Rasmussen, S.G.F.; DeVree, B.T.; Zou, Y.; Kruse, A.C.; Chung, K.Y.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Chae, P.S.; Pardon, E.; Calinski, D.; Mathiesen, J.M.; Shah, S.T.A.; Lyons, J.A.; Caffrey, M.; Gellman, S.H.; Steyaert, J.; Skiniotis, G.; Weis, W.I.; Sunahara, R.K.; Kobilka, B.K. (2011). Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477** (7366): 549–55
- Reiter, E.; Ahn, S.; Shukla, A.K.; Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular Mechanism of  $\beta$ -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52** (1): 179–197
- Reiter, E.; Ayoub, M.A.; Pellissier, L.P.; Landomiel, F.; Musnier, A.; Tréfier, A.; Gandia, J.; De Pascali, F.; Tahir, S.; Yvinec, R.; Bruneau, G.; Poupon, A.; Crépieux, P. (2017).  $\beta$ -arrestin signalling and bias in hormone-responsive GPCRs. *Mol. Cell. Endocrinol.* **449** 28–41
- Reynolds, T.; de Zafra, C.; Kim, A.; Gelzleichter, T.R. (2013). in *Nonclinical Dev. Nov. Biol. Biosimilars, Vaccines Spec. Biol.* 3–33 (Elsevier, 2013).
- Rote Liste (2017). Fachinformation: Coumadin® 5 mg (Wirkstoff: Warfarin-Natrium), Bristol-Myers Squibb. *Rote List. Serv. GmbH, Frankfurt/Main* 1–6
- Rundle, F.F. (1957). Management of exophthalmos and related ocular changes in Graves' disease. *Metabolism.* **6** (1): 36–48
- Russo, D.; Betterle, C.; Arturi, F.; Chiefari, E.; Girelli, M.E.; Filetti, S. (2000). A novel mutation in the thyrotropin (TSH) receptor gene causing loss of TSH binding but constitutive receptor activation in a family with resistance to TSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85** (11): 4238–4242

- Sanders, J.; Evans, M.; Premawardhana, L.D.K.E.; Depraetere, H.; Jeffreys, J.; Richards, T.; Furmaniak, J.; Rees Smith, B. (2003). Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet* **362** (9378): 126–128
- Sanders, J.; Chirgadze, D.Y.; Sanders, P.; Baker, S.; Sullivan, A.; Bhardwaja, A.; Bolton, J.; Reeve, M.; Nakatake, N.; Evans, M.; Richards, T.; Powell, M.; Miguel, R.N.; Blundell, T.L.; Furmaniak, J.; Smith, B.R. (2007). Crystal Structure of the TSH Receptor in Complex with a Thyroid-Stimulating Autoantibody. *Thyroid* **17** (5): 395–410
- Sanders, J.; Jeffreys, J.; Depraetere, H.; Richards, T.; Evans, M.; Kiddie, A.; Brereton, K.; Groenen, M.; Oda, Y.; Furmaniak, J.; Rees Smith, B. (2002). Thyroid-Stimulating Monoclonal Antibodies. *Thyroid* **12** (12): 1043–1050
- Sanders, P.; Young, S.; Sanders, J.; Kabelis, K.; Baker, S.; Sullivan, A.; Evans, M.; Clark, J.; Wilmot, J.; Hu, X.; Roberts, E.; Powell, M.; Miguel, R.N.; Furmaniak, J.; Smith, B.R.; Núñez Miguel, R.; Furmaniak, J.; Rees Smith, B. (2011). Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody. *J. Mol. Endocrinol.* **46** (2): 81–99
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74** (12): 5463–7
- Schaaf, L.; Leiprecht, A.; Saji, M.; Hübner, U.; Usadel, K.H.; Kohn, L.D. (1997). Glycosylation variants of human TSH selectively activate signal transduction pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* **132** (1–2): 185–194
- Schaarschmidt, J.; Nagel, M.B.M.; Huth, S.; Jaeschke, H.; Moretti, R.; Hintze, V.; Von Bergen, M.; Kalkhof, S.; Meiler, J.; Paschke, R. (2016). Rearrangement of the extracellular domain/extracellular loop 1 interface is critical for thyrotropin receptor activation. *J. Biol. Chem.* **291** (27): 14095–14108
- Schaarschmidt, J.; Huth, S.; Meier, R.; Paschke, R.; Jaeschke, H. (2014). Influence of the hinge region and its adjacent domains on binding and signaling patterns of the thyrotropin and follitropin receptor. *PLoS One* **9** (10): e111570
- Scheerer, P.; Sommer, M.E. (2017). Structural mechanism of arrestin activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **45** 160–169
- Schlüter, A.; Horstmann, M.; Diaz-Cano, S.; Plöhn, S.; Stähr, K.; Mattheis, S.; Oeverhaus, M.; Lang, S.; Flögel, U.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Eckstein, A.; Banga, J.P. (2018). Genetic immunization with mouse thyrotrophin hormone receptor plasmid breaks self-tolerance for a murine model of autoimmune thyroid disease and Graves' orbitopathy. *Clin. Exp. Immunol.* **191** (3): 255–267
- Schmidt, A.; Wiesner, B.; Weißhart, K.; Schulz, K.; Furkert, J.; Lamprecht, B.; Rosenthal, W.; Schüle, R. (2009). Use of Kaede fusions to visualize recycling of G protein-coupled receptors. *Traffic* **10** (1): 2–15
- Schrödinger LLC (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- Sheldrick, G.M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C, Struct. Chem.* **71** (Pt 1): 3–8
- Sheldrick, G.M. (2015). SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* **71** (1): 3–8
- Smith, T.J.; Janssen, J.A.M.J.L. (2017). Building the case for insulin-like growth factor receptor-I involvement in thyroid-associated ophthalmopathy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7** (JAN): 167
- Smith, T.J.; Kahaly, G.J.; Ezra, D.G.; Fleming, J.C.; Dailey, R.A.; Tang, R.A.; Harris, G.J.; Antonelli, A.; Salvi, M.; Goldberg, R.A.; Gigantelli, J.W.; Couch, S.M.; Shriver, E.M.; Hayek, B.R.; Hink, E.M.; Woodward, R.M.; Gabriel, K.; Magni, G.; Douglas, R.S. (2017). Teprotumumab for Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *N. Engl. J. Med.* **376** (18): 1748–1761

- Stephenson, R.P. (1997).** A modification of receptor theory. 1956. *Br. J. Pharmacol.* **120** (4 Suppl): 106–20; discussion 103–5
- Švecová, P.; Petr, J. (2019).** Separation of cetirizine enantiomers by capillary electrophoresis with a dual selector system based on borate-glucose complexes and sulfated- $\beta$ -cyclodextrin. *Talanta* **198** 154–158
- Szkudlinski, M.W. (2015).** New frontier in glycoprotein hormones and their receptors structure-function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6** (OCT): 155
- Teichmann, A.; Gibert, A.; Lampe, A.; Grzesik, P.; Rutz, C.; Furkert, J.; Schmoranzner, J.; Krause, G.; Wiesner, B.; Schüle, R. (2014).** The specific monomer/dimer equilibrium of the corticotropin-releasing factor receptor type 1 is established in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **289** (35): 24250–62
- Todorova-Balvay, D.; Stoilova, I.; Gargova, S.; Vijayalakshmi, M. a (2007).** An efficient two step purification and molecular characterization of beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *J. Mol. Recognit.* **19** 299–304
- Tsui, S.; Naik, V.; Hoa, N.; Hwang, C.J.; Afifyan, N.F.; Sinha Hikim, A.; Gianoukakis, A.G.; Douglas, R.S.; Smith, T.J. (2008).** Evidence for an association between thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor 1 receptors: a tale of two antigens implicated in Graves' disease. *J. Immunol.* **181** (6): 4397–405
- Turcu, A.F.; Kumar, S.; Neumann, S.; Coenen, M.; Iyer, S.; Chiriboga, P.; Gershengorn, M.C.; Bahn, R.S. (2013).** A small molecule antagonist inhibits thyrotropin receptor antibody-induced orbital fibroblast functions involved in the pathogenesis of graves ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98** (5): 2153–2159
- Ungerer, M.; Faßbender, J.; Holthoff, H. (2018).** Antigen-specific therapy of Graves' disease and orbitopathy by induction of tolerance. *Front Biosci.* **in press**
- Ungerer, M.; Faßbender, J.; Li, Z.; Münch, G.; Holthoff, H.-P. (2017).** Review of Mouse Models of Graves' Disease and Orbitopathy-Novel Treatment by Induction of Tolerance. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **52** (2): 182–193
- Urizar, E.; Montanelli, L.; Loy, T.; Bonomi, M.; Swillens, S.; Gales, C.; Bouvier, M.; Smits, G.; Vassart, G.; Costagliola, S. (2005).** Glycoprotein hormone receptors: Link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J.* **24** (11): 1954–1964
- Vassart, G.; Costagliola, S. (2004).** A Physiological Role for the Posttranslational Cleavage of the Thyrotropin Receptor? *Endocrinology* **145** (1): 1–3
- Vassart, G.; Dumont, J.E. (1992).** The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr. Rev.* **13** (3): 596–611
- Vassart, G.; Pardo, L.; Costagliola, S. (2004).** A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem. Sci.* **29** (3): 119–126
- Vlaeminck-Guillem, V.; Ho, S.-C.; Rodien, P.; Vassart, G.; Costagliola, S. (2002).** Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol. Endocrinol.* **16** (4): 736–746
- Voigt, C.; Holzapfel, H.-P.; Meyer, S.; Paschke, R. (2004).** Increased expression of G-protein-coupled receptor kinases 3 and 4 in hyperfunctioning thyroid nodules. *J. Endocrinol.* **182** (1): 173–82
- Wacker, D.; Stevens, R.C.; Roth, B.L. (2017).** How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **170** (3): 414–427
- Wang, W.; Qiao, Y.; Li, Z. (2018).** New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 1–20

- Weierstall, U.; James, D.; Wang, C.; White, T.A.; Wang, D.; Liu, W.; Spence, J.C.H.; Bruce Doak, R.; Nelson, G. et al. (2014). Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun.* **5** 3309
- Weiner, M.P.; Costa, G.L.; Schoettlin, W.; Cline, J.; Mathur, E.; Bauer, J.C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151** (1–2): 119–123
- Wiersinga, W.M.; Smit, T.; van der Gaag, R.; Koornneef, L. (1988). Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and onset of thyroidal Graves' disease. *J. Endocrinol. Invest.* **11** (8): 615–9
- Wiersinga, W.M.; Bartalena, L. (2002). Epidemiology and Prevention of Graves' Ophthalmopathy. *Thyroid* **12** (10): 855–860
- Worth, C.L.; Kreuchwig, F.; Tiemann, J.K.S.; Kreuchwig, A.; Ritschel, M.; Kleinau, G.; Hildebrand, P.W.; Krause, G. (2017). GPCR-SSFE 2.0 - A fragment-based molecular modeling web tool for Class A G-protein coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* **45** (W1): W408–W415
- Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* **81** (3): 1097–1142
- Zhang, D.; Gao, Z.-G.; Zhang, K.; Kiselev, E.; Crane, S.; Wang, J.; Paoletta, S.; Yi, C.; Ma, L.; Zhang, W.; Han, G.W.; Liu, H.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Jiang, H.; Stevens, R.C.; Jacobson, K.A.; Zhao, Q.; Wu, B. (2015). Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature* **520** (7547): 317–321
- Zhang, J.; Yang, J.; Jang, R.; Zhang, Y. (2015). GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure* **23** (8): 1538–1549
- Zhang, L.; Grennan-Jones, F.; Draman, M.S.; Lane, C.; Morris, D.; Dayan, C.M.; Tee, A.R.; Ludgate, M. (2014). Possible targets for nonimmunosuppressive therapy of graves' orbitopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99** (7): jc20134182
- Zoenen, M.; Urizar, E.; Swillens, S.; Vassart, G.; Costagliola, S. (2012). Evidence for activity-regulated hormone-binding cooperativity across glycoprotein hormone receptor homomers. *Nat. Commun.* **3** 1007
- van Zundert, G.C.P.; Rodrigues, J.P.G.L.M.; Trellet, M.; Schmitz, C.; Kastiris, P.L.; Karaca, E.; Melquiond, A.S.J.; van Dijk, M.; de Vries, S.J.; Bonvin, A.M.J.J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **428** (4): 720–725

## 6 Publikationsliste

Teile dieser Dissertation sind in den folgenden Publikationen enthalten:

**Marcinkowski, P.; Kreuchwig, A.; Mendieta, S.; Hoyer, I.; Witte, F.; Furkert, J.; Rutz, C.; Lentz, D.; Krause, G.; Schüle, R. (2019).** Thyrotropin receptor: Allosteric Modulators Illuminate Intramolecular Signaling Mechanisms at the Interface of Ecto- and Transmembrane Domain. *Mol. Pharmacol.* **96** (4): 452–462

**Marcinkowski, P.; Hoyer, I.; Specker, E.; Furkert, J.; Rutz, C.; Neuenschwander, M.; Sobottka, S.; Sun, H.; Nazare, M.; Berchner-Pfannschmidt, U.; von Kries, J.P.; Eckstein, A.; Schüle, R.; Krause, G. (2019).** A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* **29** (1): 111–123

**Krause, G.; Marcinkowski, P. (2018).** Correction: Intervention Strategies into Glycoprotein Hormone Receptors for Modulating (Mal-)function, with Special Emphasis on the TSH Receptor. *Horm. Metab. Res.* **50** (12): e8

**Krause, G.; Hoyer, I.; Specker, E.; Furkert, J.; Marcinkowski, P.; von Kries, J.; Neuenschwander, M.; Nazare M (2017).** Antagonists of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor (TSHR). *Patentanmeldung WIPO Publ. Number WO 2017/186793 A1*

Weitere Publikationen:

**Kleinau, G.; Worth, C.L.; Kreuchwig, A.; Biebermann, H.; Marcinkowski, P.; Scheerer, P.; Krause, G. (2017).** Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8** (APR): 86

**Dahlmann, M.; Okhrimenko, A.; Marcinkowski, P.; Osterland, M.; Herrmann, P.; Smith, J.; Heizmann, C.W.; Schlag, P.M.; Stein, U. (2014).** RAGE mediates S100A4-induced cell motility via MAPK/ERK and hypoxia signaling and is a prognostic biomarker for human colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* **5** (10): 3220–33

Konferenzbeiträge:

P. Marcinkowski, G. Krause

Vortrag: "Search for the binding site of a new selective TSHR antagonist with the potential to block autoimmune antibodies"

31. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung - Berlin, Deutschland

10. – 12. Dezember 2015

I. Hoyer, P. Marcinkowski, E. Specker, J. Furkert, M. Nazaré, J.-P. von Kries, C. Rutz, R. Schüle, G. Krause

Vortrag: „Identification of a new highly TSH-receptor-selective small molecule inhibitor“

39th Annual Meeting of the European Thyroid Association – Kopenhagen, Dänemark

3. – 6. September 2016

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, M. Nazaré, J.-P. von Kries, C. Rutz, R. Schüle, G. Krause

Poster: "Identification of a new highly TSH-receptor-selective small molecule inhibitor"

41th Symposium on Hormones and Cell Regulation of the European Society of Endocrinology – Mont Ste Odile, Frankreich

5. – 8. Oktober 2016

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, J.-P. v. Kries, C. Rutz, R. Schüle, G. Krause

Vortrag: "Identification of a new highly TSH-receptor-selective small molecule inhibitor"

GLISTEN Symposium – Porto, Portugal

29. – 31. März 2017

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, U. Berchner-Pfannschmidt, R. Schüle, A. Eckstein, G. Krause

Vortrag: "A new small molecule TSH-receptor selective antagonist towards Graves' Ophthalmopathy"

40th Annual Meeting of the European Thyroid Association – Belgrad, Serbien

9. – 12. September 2017

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, R. Schüle, G. Krause

Poster: "Development of a new highly TSH-receptor selective small molecule that functions as NAM for TSH and simultaneously as NAM for an allosteric small molecule agonist"

Keystone Symposium: GPCR Structure and Function: Taking GPCR Drug Development and Discovery to the Next Level – Santa Fe, Vereinigte Staaten

16. – 20. Februar 2018

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, U. Berchner-Pfannschmidt, A. Eckstein, R. Schülein, G. Krause

Vortrag: “A small molecule TSH -receptor antagonist towards Graves’ orbitopathy without effect on closely related FSH and LHCG receptors”

61. Deutscher Kongress für Endokrinologie – Bonn, Deutschland

14. – 16. März 2018

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, H. Sun, R. Schülein, G. Krause

Vortrag: “Targeting the TSH receptor by small molecules as NAMs”

1. Berlin Interdisciplinary Symposium for Young GPCR Researchers – Berlin, Deutschland

12. April 2018

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, R. Schülein, G. Krause

Poster: “TSH Receptor Mutations Reveal a Novel Allosteric Binding Site for a Selective Small Molecule Inhibitor”

Early Career Scientist Forum on GPCR Signal Transduction (ECSF – GPCR) – Berlin, Deutschland

11. – 14- Juli 2018

P. Marcinkowski, I. Hoyer, E. Specker, J. Furkert, U. Berchner-Pfannschmidt, R. Schülein, A. Eckstein, G. Krause

Poster: “Highly selective TSH-receptor small molecule antagonist inhibits activation by TSH, antibodies, small agonist, sera from GO patients and pathogenic activating mutations”

41st Annual Meeting of the European Thyroid Association – Newcastle, Vereinigtes Königreich

15. -18. September 2018

P. Marcinkowski, A. Kreuchwig, S. Mendieta, I. Hoyer, F. Witte, J. Furkert, C. Rutz, D. Lentz, G. Krause, R. Schülein

Vortrag: “Deciphering the course of molecular activation mechanisms at thyrotropin receptor by positive and negative allosteric modulators”

62. Deutscher Kongress für Endokrinologie – Göttingen, Deutschland

20. – 22. März 2019

## 7 Anhang

### 7.1 Liste aller getesteten Substanzen

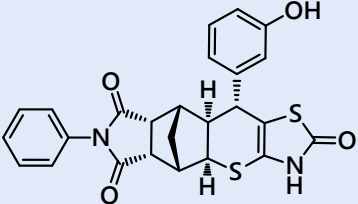
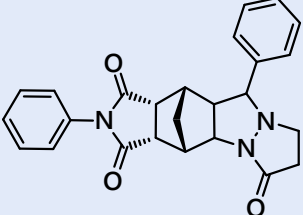
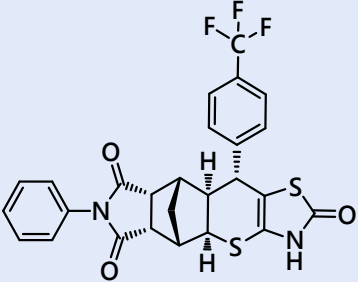
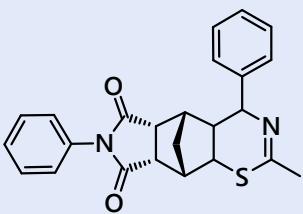
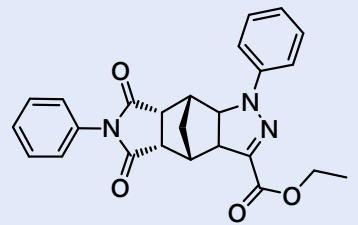
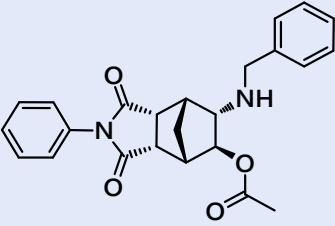
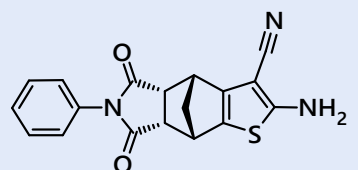
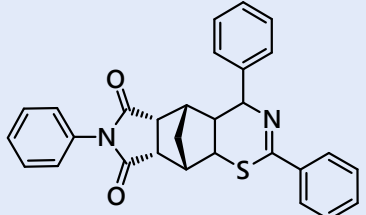
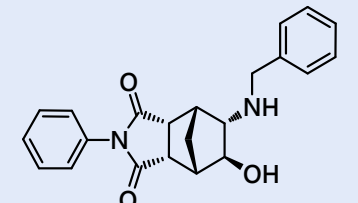
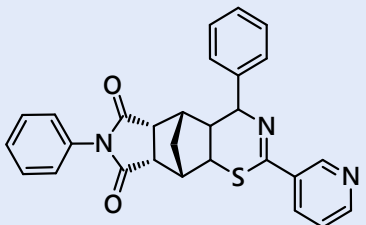
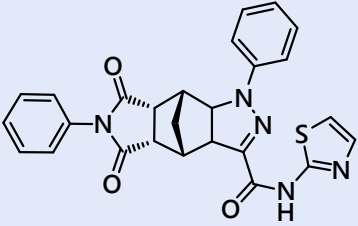
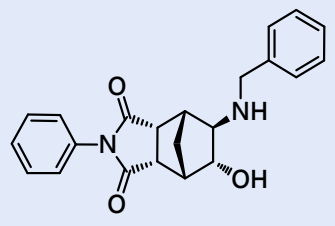
**Tabelle 10. Strukturformeln und Wirkungen auf die cAMP-Akkumulation, sortiert nach der Substanznummer.** Zu jeder Substanz sind die antagonistische Wirkung (% Inhibition bei 50  $\mu$ M Substanz in Anwesenheit von 2 mIU/ml bTSH) und die agonistische Wirkung (als n-Faches der Basalaktivität bei 50  $\mu$ M Substanz ohne TSH) angegeben. Für S37 sind die Strukturformeln beider Enantiomere dargestellt. Bei Substanzen, wo die Stereochemie nicht klar definiert war, sind die Keilstriche nicht eingezeichnet. Für S79 bis S128 ist nur ein Enantiomer dargestellt, auch wenn sie als Racemat (*rac*) vorlagen.

Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal	Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal
37		48	5,2	40		2,0	-0,1
				41		2,7	-0,1
37a		71	4,9	42		36	0,4
37b		0,8	0,4	43		32	0,5
39		-5,1	-0,1	44		28	5,6

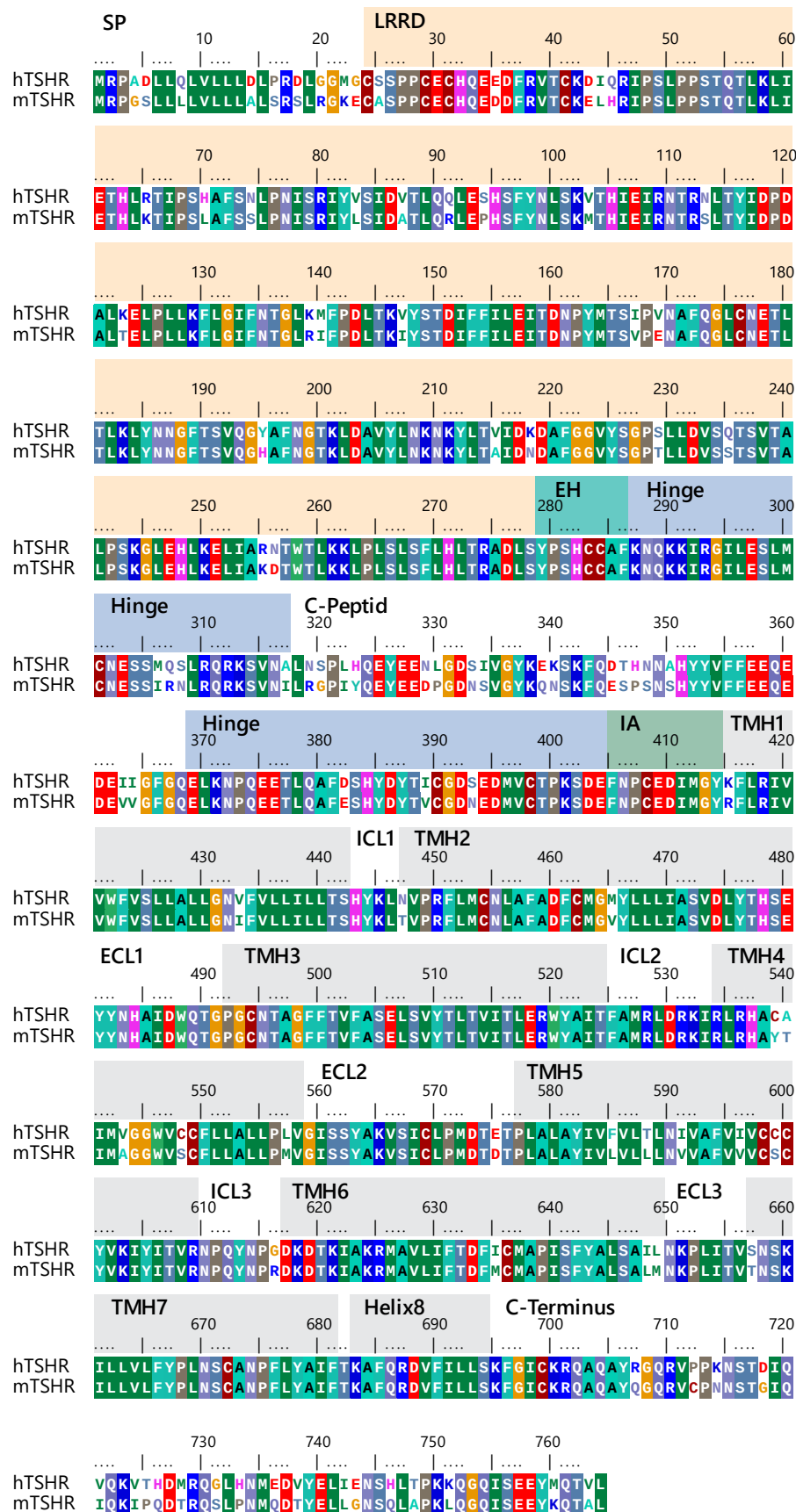


Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal	Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal
45		2,5	0,9	65		25,0	0,6
46		-6,8	0,1	66		23,7	0,3
47		40	15,3	67		-11,0	0,5
48		-3,0	0,05	68		-5,2	0,1
49		26	1,9	69		0,8	-0,1
50		-15	0,1	70		18,6	1,3
63		16,5	-0,1	71		-0,5	0,0
64		15,4	0,1	72		8,6	0,1
				79 rac		29	-0,01

Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal	Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal
80 <i>rac</i>		25	0,4	101 <i>rac</i>		10	7,2
87 <i>rac</i>		29	5,1	102 <i>rac</i>		6,3	0,7
89 <i>rac</i>		22	2,8	121 <i>rac</i>		11	20
90 <i>rac</i>		53	2,5	122 <i>rac</i>		38	16
96 <i>rac</i>		34	7,2	123 <i>rac</i>		11	28
98 <i>rac</i>		8,3	0,2	124 <i>rac</i>		22	10
99 <i>rac</i>		-3,1	5,6				
100 <i>rac</i>		34	0,6				

Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal	Nr.	Strukturformel	% Inhibition	n-fach über basal
125 <i>rac</i>		34	1,0	162		8,8	0,1
128 <i>rac</i>		4,8	5,6	163		10,6	0,7
158		19,1	2,1	164		14,8	-0,1
159		-2,0	0,0	165		9,1	4,6
160		8,0	0,0	166		48,0	21,0
161		25,0	0,1	167		4,1	-0,1

## 7.2 Sequenz-Alignment des murinen und humanen TSHR



### 7.3 Pharmakokinetik-Parameter von S37a

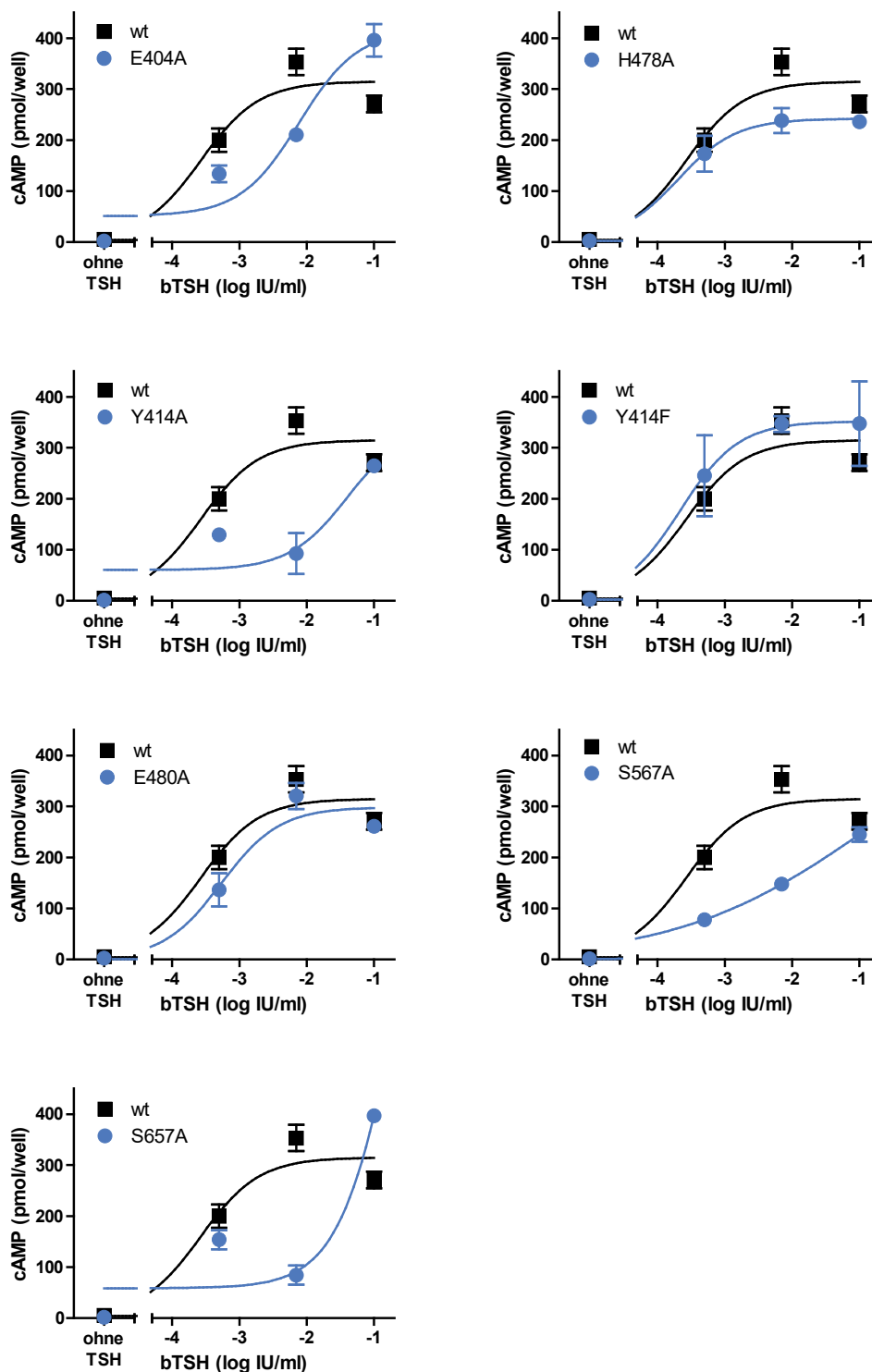
**Tabelle 11. Bericht der Pharmakokinetik-Parameter nach einmaliger Applikation von S37a (Vgl. Abb. 32).**

Tierart	Maus	
Stamm	SWISS (CD1)	
Geschlecht	männlich	
Körpergewicht (g)	38-43	
Testobjekt	S37a	
Molekulargewicht	460,1	
Applikationsart	i.v.	p.o.
Vehikel	DMSO/PEG400 (20:80)	1 % Tween 80 in 0,5 % MC
Dosierung (mg/kg)	2,5	10
Volumen (ml/kg)	2	10
PK Software	Kinetica 5.0	Kinetica 5.0
C <sub>p0</sub> (ng/ml)	871,3	-
C <sub>max</sub> (ng/ml)	-	540,9
t <sub>max</sub> (h)	-	0,3
C <sub>z</sub> (ng/ml)	4,2	0,4
t <sub>z</sub> (h)	7,0	24,0
t <sub>1/2z</sub> (h)	1,2	2,9
AUC <sub>0-tz</sub> (ng × h/ml)	464	999
AUC <sub>0-∞</sub> (ng × h/ml)	472	1000
%AUC <sub>extra</sub>	2	0
f	1,0	0,53
F (%)	100	53,0
V <sub>z</sub> (l/kg)	9,32	21,88
CL (l/(h*kg))	5,30	5,30
Vz/f (l/kg)	-	41,27
CL/f (l/(h*kg))	-	9,998

Legende	
C <sub>p0</sub>	initiale berechnete Konzentration
C <sub>max</sub>	maximale Konzentration
t <sub>max</sub>	Zeit bis zur maximalen Konzentration
C <sub>z</sub>	letzte analytisch quantifizierbare Konzentration
t <sub>z</sub>	Zeit bis zur Probe mit der letzten analytisch quantifizierbaren Konzentration
t <sub>1/2z</sub>	Halbwertszeit am Ende der Konzentrations-Zeit-Kurve
AUC <sub>0-tz</sub>	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve bis zur Zeit t <sub>z</sub>
AUC <sub>0-∞</sub>	extrapolierte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve bis unendlich
%AUC <sub>extra</sub>	prozentualer Anteil der AUC nach t <sub>z</sub> zur gesamt-AUC
f	Bioverfügbarkeit
F (%)	Bioverfügbarkeit in Prozent
V <sub>z</sub>	Verteilungsvolumen
CL	Gesamt-Clearance
Vz/f	nicht auf die Bioverfügbarkeit normiertes Verteilungsvolumen
CL/f	nicht auf die Bioverfügbarkeit normierte Clearance

## 7.4 bTSH-Konzentrations-Wirkungskurven der TSHR-Mutanten zur Identifizierung der Bindungsstelle von S37a

HEK-Zellen wurden transient mit TSHR-Mutanten mit extrazellulärem FLAG- und intrazellulärem GFP-*Tag* transfiziert. Die cAMP-Akkumulation wurde mittels Radioimmunoassay gemessen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.



## 7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese.....	40
Tabelle 2. PCR-Programm für die Amplifikation des murinen TSHR.....	41
Tabelle 3. Verwendete Primer und PCR-Programme für die restriktionsfreie Klonierung.....	42
Tabelle 4. Überblick über verwendete Mengen der Reagenzien für die transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen.....	43
Tabelle 5. Eigenschaften der verwendeten Fluorophore und Einstellungen am LSM. ....	44
Tabelle 6. Eigenschaften der verwendeten Fluorophore und Einstellungen am Durchflusszytometer FACSCalibur. ....	45
Tabelle 7. Lösungen und Puffer für 10-prozentige Polyacrylamid-Gele.....	47
Tabelle 8. Ausgewählte S37-Analoga aus Abb. 18 bis 20, sortiert nach Inhibition der cAMP-Akkumulation. ....	72
Tabelle 9. Ausgewählte S37a-Analoga aus Abb. 21, sortiert nach Inhibition der cAMP-Akkumulation. ....	75
Tabelle 10. Strukturformeln und Wirkungen auf die cAMP-Akkumulation, sortiert nach der Substanznummer.....	123
Tabelle 11. Bericht der Pharmakokinetik-Parameter nach einmaliger Applikation von S37a (Vgl. Abb. 32).....	128

## 7.6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Strukturbestandteile des TSHR.....	16
Abb. 2. S37 und Kompetitivität am TSHR.....	26
Abb. 3. Chirale Trennung der S37-Enantiomere. ....	54
Abb. 4. Funktionelle Charakterisierung der S37-Enantiomere.....	54
Abb. 5. Identifizierung der absoluten Konfiguration von S37a.....	55
Abb. 6. Trunkierte TSHR und deren Expression in HEK-Zellen. ....	57
Abb. 7. Funktionelle Charakterisierung der trunkierten TSHR-Konstrukte. ....	58
Abb. 8. Die trunkierten TSHR werden von S37 inhibiert.....	59
Abb. 9. S37 ist ein nichtkompetitiver Antagonist von C2 an der Transmembrandomäne (TMD) des TSHR. ....	60
Abb. 10. TSHR-FSHR-Chimären und deren Expression in transient transfizierten HEK-Zellen.....	61
Abb. 11. Nur die FSHR-TSHR-Chimäre mit TSHR- <i>Hinge</i> /TMD wird wie wt- TSHR von S37a inhibiert. ....	62
Abb. 12. Etablierung eines Radioliganden-Bindungsassays mit <sup>125</sup> I-bTSH. ....	63
Abb. 13. Verdrängungs-Assay mit S37a und <sup>125</sup> I-bTSH.....	64
Abb. 14. Zelloberflächen-Expression von Varianten des TSHR mit konstitutiv aktivierenden Mutationen (CAM) in HEK-Zellen.....	65

Abb. 15. Effekt von S37a auf die konstitutive Aktivität von TSHR-Varianten (CAM) und deren Lage im Rezeptor.....	66
Abb. 16. Antagonistischer Effekt von S37a auf TSHR-Mutationen in extrazellulären Bereichen der Transmembrandomäne. ....	67
Abb. 17. Strukturbestandteile von S37a, die für Struktur-Funktions-Analysen verändert wurden.....	68
Abb. 18. Antagonismus von S37-Derivaten (Synthese am FMP) mit Substituenten an den Phenylringen. ....	69
Abb. 19. Agonismus von S37-Derivaten mit einzelnen Substituenten an den Phenylringen (Synthese am FMP).....	70
Abb. 20. Die Wirkung von S37-Analoga mit mehreren Substituenten an den Phenylringen auf den TSHR (Katalog-SAR).....	71
Abb. 21. Wirkung S37a-ähnlicher Substanzen mit modifiziertem heterozyklischem Grundgerüst auf den TSHR.....	74
Abb. 22. S37a inhibiert monoklonale humane und murine Thyreoidea-stimulierende Antikörper (TSAb). ....	76
Abb. 23. S37a hemmt die TSHR-Aktivierung durch Patientenserum <i>ex vivo</i> . ....	77
Abb. 24. Antagonismus: S37-Derivate hemmen die Hormon-induzierte cAMP-Bildung nur am TSHR. ....	78
Abb. 25. Die agonistische Wirkung von S37-Derivaten auf die Gonadotropin-Rezeptoren. ....	79
Abb. 26. Charakterisierung der U2OS-TSHR/ $\beta$ -Arrestin-1-Zellen. ....	80
Abb. 27. Inhibition der $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung durch S37a.....	81
Abb. 28. M22 aktiviert die $\beta$ -Arrestin-1-Rekrutierung am TSHR erst ab 1 $\mu$ g/ml. ....	81
Abb. 29. Einfluss von bTSH und S37a auf die Aktivität von NFAT ( <i>nuclear factor of activated T cells</i> ) in HEK-TSHR-Zellen.....	82
Abb. 30. Expressionsuntersuchung des murinen (m)TSHR in HEK-Zellen mittels LSM. ....	83
Abb. 31. Vergleich der cAMP-Signaltransduktion von mTSHR und hTSHR. ....	84
Abb. 32. Pharmakokinetik von S37a in Mäusen nach einmaliger Applikation. ....	84
Abb. 33. Pharmakokinetik nach wiederholter Applikation höherer oraler S37a-Dosierungen.....	85
Abb. 34. Schild-Regression für die Interaktion von S37 und bTSH am TSHR.....	89
Abb. 35. Schematische Darstellung möglicher räumlich getrennter intramolekularer Signal-Pfade für $G_s$ und $\beta$ -Arrestin 1 im TSHR.....	90
Abb. 36. Schild-Regression für die Interaktion von Antag3 und C2 am trunkierten TSHR-Konstrukt EDI. ....	92
Abb. 37. <i>Docking</i> von S37a in das Homologiemodell des trunkierten TSHR-Konstrukts EDI. ....	94



Abb. 38. Das Gesamt-TSHR-Modell im inaktiven Zustand mit einer präzisierten Konformation des Übergangs von der Ektodomäne zur TMD und einer Bindungstasche für S37a.....	96
Abb. 39. Zusammenfassung der wesentlichen Struktur-Funktions-Beziehungen. ....	100
Abb. 40. S37a-Wirkung auf Patientenserum bei milder und schwerer EO.....	103

Abb. 2, 4, 5, 22, 23, 24, 27, 32 und 35 wurden so oder ähnlich im Journal *Thyroid* veröffentlicht (Marcinkowski *et al.*, 2019). Abb. 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 16, 37 und 38 wurden so oder ähnlich zur Veröffentlichung im Journal *Molecular Pharmacology* eingereicht.

## 7.7 Abkürzungsverzeichnis

Einbuchstabencode der Aminosäuren									
A	Alanin	F	Phenylalanin	K	Lysin	P	Prolin	T	Threonin
C	Cystein	G	Glycin	L	Leucin	Q	Glutamin	V	Valin
D	Aspartat	H	Histidin	M	Methionin	R	Arginin	W	Tryptophan
E	Glutamat	I	Isoleucin	N	Asparagin	S	Serin	Y	Tyrosin

AG	Arbeitsgruppe
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bandpass
CAM	konstitutiv aktivierende Mutation(en)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Zirkulardichroismus
CH	<i>converging helix</i> , siehe EH
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> (Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters)
cpm	<i>counts</i> (Zähler) pro Minute
CRE	<i>cAMP-response element</i>
CREB	CRE-bindendes Protein
C-Terminus	Carboxyterminus
CYP450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
Da	Dalton
DFT	Dichtefunktionaltherorie
dpm	<i>disintegrations</i> (Zerfälle) pro Minute
EC <sub>50</sub> , EC <sub>80</sub>	mittlere bzw. 80-prozentige effektive Konzentration
ECL	extrazelluläre Schleife ( <i>extracellular loop</i> )
EH	extrazelluläre Helix der <i>Hinge</i> -Region (TSHR: Y <sub>279</sub> PSHCCAF <sub>286</sub> )
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EO	endokrine Orbitopathie, auch Ophthalmopathie ( <i>Graves' orbitopathy</i> )
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
FSHR	Follitropin-Rezeptor
GO	<i>Graves' Orbitopathy</i> , auch <i>Ophthalmopathy</i> (endokrine Orbitopathie)
(E)GFP	( <i>enhanced</i> ) <i>green fluorescent protein</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPHR	Glykoproteinhormon-Rezeptoren
GRK	GPCR-Kinasen
HEK	<i>human embryonal kidney</i> (Zelllinie HEK-293T aus embryonalen Nierenzellen)

HHT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatografie)
HRMS	hochauflösende ( <i>high resolution</i> ) Massenspektrometrie
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICH	International Conference on Harmonisation
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
IU	internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
LHCGR	Lutropin-Choriongonadotropin-Rezeptor
LP	Langpass
LRRD	<i>leucine-rich repeat domain</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
N-Terminus	Aminoterminus
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PA-S	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
rac.	Racemat
RIA	Radioimmunoassay
R-PE	R-Phycoerythrin
rpm	Runden pro Minute (bei der Zentrifugation)
SDS-PAGE	Natrium-( <i>sodium</i> )-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SML	<i>small molecule ligands</i> (niedermolekulare Liganden)
SP	Signalpeptid (Signalsequenz)
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	Tetraiodthyronin (Thyroxin)
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranhelix
TRH	Thyreoliberin ( <i>thyrotropin releasing hormone</i> )
TSAb	Thyreoidea-stimulierende(r) Antikörper
(b)TSH	(bovines) Thyreotropin (Thyreoidea-stimulierendes Hormon)
TSHR	Thyreotropin-Rezeptor
U	Enzymeinheit
wt	Wildtyp
WB	<i>Western Blot</i>